

**CYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN NORMALEN, ADULTEN
RATTENHEPATOZYTEN UND AN
LEBERZELLEN IN VERSCHIEDENEN
STADIEN DER NEOPLASTISCHEN
TRANSFORMATION**

Disbui. München

1988

Birgit Ulrike Holecek



Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. M. Eder

CYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN NORMALEN, ADULTEN
RATTENHEPATOZYTEN UND AN LEBERZELLEN IN VERSCHIE-
DENEN STADIEN DER NEOPLASTISCHEN TRANSFORMATION

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Birgit Ulrike Holecek

aus

Mannheim

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Berichterstatter:.....1. Prof.Dr.H.M. Rabes
.....2. Prof. Dr. H.J. Kolb

Mitberichterstatter:.....1. Prof.Dr.M. Eder
.....2. Prof. Dr. W. Neupert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:.....Prof.Dr.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:...25.02.1988

Man lebt um der Mühsal
des Lebens willen, um
des Steines willen, den
man zu dem fernen,
rätselfaften Werk bei-
trägt

Emil Zola



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555407_0017

Meinem Vater

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. M. Rabes für die interessante Themenstellung, die großzügige Förderung und stets gewährte Beratung.

Frau Dipl. Ing. R. Kerler danke ich herzlich für die Entwicklung der Zell-Linien und die Unterstützung in technischen Fragen.

Weiterhin danke ich Frau M. Metzger für die Anfertigung histologischer Schnitte und Frau U. Marx für ihre Hilfsbereitschaft in der Zell-Kultur.

Frau L. Döhle und Herrn H. Hampe danke ich vielmals für die phototechnischen Ausführungen, sowie Frau P. Tränkel für die sorgfältige Ausarbeitung des Manuskripts.

Die fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen konnten freundlicherweise in der Abteilung für pädiatrische Genetik und pränatale Diagnostik der Universität München (Leiter: Prof. Dr. J. Murken) angefertigt werden, wofür ich mich bedanken möchte.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Dr.-Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	2
2. MATERIAL UND METHODE	6
2.1. Karyotyp normaler, adulter Hepatozyten der Ratte.....	6
2.1.1. Tiere.....	6
2.1.2. Partielle Hepatektomie.....	6
2.1.3. Colchizin-Injektion.....	6
2.1.4. Collagenase-Perfusion der Leber.....	8
2.1.5. Präparation der Leberzellen nach der Perfusion.....	11
2.1.6. Chromosomen-Präparation.....	11
2.1.7. Trypsin-Giemsa-Färbung.....	12
2.2. Darstellung des Replikationsmusters des Chromosoms # 1 nach Hydroxyharnstoff-Synchronisation in vivo.....	12
2.2.1. Hydroxyharnstoff-Infusion.....	12
2.2.2. ³ H-Thymidin-Markierung der Chromosomen in der frühen S-Phase.....	13
2.2.3. Autoradiographie.....	15
2.2.4. Photographie.....	15
2.3. Auswertung.....	16
2.4. Karyotyp praeneoplastischer und neoplastischer Leberzellen.....	18
2.4.1. Herkunft und Kultur der Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42.....	18

II

2.4.2.	Tumorigenitäts-Prüfung auf der Nacktmaus.....	21
2.4.3.	Kultur der Zell-Linie CL 8238-42 nach in vivo Passagierung.....	21
2.4.4.	Chromosomen-Präparation.....	22
2.4.5.	Trypsin-Giemsa-Färbung.....	22
2.4.6.	BrdU-Acridinorange-Färbung.....	23
2.5.	Darstellung des Replikationsmusters des Chromosoms # 1 nach Hydroxyharnstoff- Synchronisation in vitro.....	24
2.5.1.	Hydroxyharnstoff-Synchronisation.....	24
2.5.2.	³ H-Thymidin-Markierung.....	24
2.5.3.	Autoradiographie.....	25
2.5.4.	Photographie.....	25
2.6.	Auswertung.....	26
3.	ERGEBNISSE	27
3.1.	Wirkung der Colchizin-Dosis und -Exposi- tionszeit auf die Darstellung von Chro- mosomen.....	27
3.1.1.	Untersuchung der Colchizin-Dosis in vivo.....	27
3.1.2.	Untersuchung der Colchizin-Dosis und -Expositionszeit in vitro.....	31
3.2.	Präparationstechnik und Darstellung des Karyo- typs normaler, adulter Hepatozyten von Rattus norvegicus.....	33
3.2.1.	Gewinnung der Chromosomen aus normalen He- patozyten der Ratte.....	34
3.2.2.	Darstellung des Karyotyps von Rattus nor- vegicus aus normalen Hepatozyten.....	36

3.3.	Tumorigenitäts-Prüfung und Darstellung der Karyotypen praeneoplastischer und neoplastischer Leberzellen nach in vitro Passagierung.....	39
3.3.1.	Tumorigenitäts-Prüfung der Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 auf der Nacktmaus.....	40
3.3.2.	Chromosomen-Aberrationen im Karyotyp der praeneoplastischen Zell-Linie CL 8244.....	43
3.3.3.	Chromosomenzahl der praeneoplastischen Zell-Linie CL 8244.....	50
3.3.4.	Chromosomen-Aberrationen im Karyotyp der neoplastischen Zell-Linie CL 8232-42.....	52
3.3.5.	Chromosomenzahl der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42.....	59
3.3.6.	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zell-Linie CL 8238-42.....	61
3.3.7.	Karyotyp der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42 nach Passagierung und Tumorbildung in der Nacktmaus.....	63
3.4.	Modell für die Darstellung des Replikations-Musters der frühen DNS-Synthese-Phase auf Chromosomen normaler Hepatozyten in vivo und praeneoplastischer Leberzellen in vitro.....	65
3.4.1.	Replikationsmuster des Chromosoms # 1 normaler Hepatozyten nach Leber-Perfusion....	66
3.4.2.	Replikationsmuster des Chromosoms # 1 normaler Hepatozyten nach Leber-Perfusion mit HU-Synchronisation der DNS-Synthese.....	66
3.4.3.	Replikationsmuster des Chromosoms # 1 der praeneoplastischen Zell-Linie CL 8244 nach HU-Synchronisation.....	67



3.4.4.	Vergleich des Replikationsmusters des Chromosoms # 1 in praeneoplastischen und normalen Hepatozyten mit und ohne HU-Synchronisation.....	70
4.	DISKUSSION	72
4.1.	Probleme bei der Darstellung des Karyotyps der Ratte aus normalen, adulten Hepatozyten nach Collagenase-Perfusion der Leber.....	72
4.2.	Cytogenetischer Vergleich durch Diethylnitrosamin initiiertter praeneo- und neoplastischer Leberzellen und mögliche Beziehungen chromosomaler Aberrationen zu Genalterationen.....	77
4.3.	Modell zur Darstellung des chromosomalen Replikationsmusters in der frühen S-Phase....	86
5.	ZUSAMMENFASSUNG	90
6.	ANHANG	92
7.	LITERATURVERZEICHNIS	96

Verzeichnis der Abkürzungen

A	= Adenin
ATP-ase	= Adenosintriphosphatase
BrdU	= 5-Brom-2-desoxyuridin
C	= Cytosin
del	= Deletion
DENA	= Diethylnitrosamin
DNS	= Desoxyribonukleinsäure
dupl.	= Duplikation
EDTA	= Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGTA	= (2-(aminoethyl)-glycoether-N,N,N', N'-tetraessigsäure, 3,6-Dioxaoctamethylen-dinitrilotetraessigsäure
FKS	= fötales Kälber-Serum
G	= Guanin
G ₁ -Phase	= Präsynthetische Phase des Zellteilungszyklus
G ₂ -Phase	= Prämitotische Phase des Zellteilungszyklus
Hepes	= 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonsäure
HSR	= homogeneously staining region
³ H-TdR	= (Methyl- ³ H)-Thymidin, bzw. Tritiummarkiertes Thymidin
HU	= Hydroxyharnstoff
inv	= Inversion
i.p.	= intraperitoneal
iso	= Iso-Chromosom

KG	= Körpergewicht
LD 50	= 50 % der Letal-Dosis
mark	= Marker-Chromosom
p	= kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	= Phosphat buffered saline
PH	= partielle Hepatektomie
q	= langer Arm eines Chromosoms
recip	= reziproke Translokation
REF	= Embryonale Rattenfibroblasten
rob	= Robertson'sche Translokation
S-Phase	= DNS-Synthese-Phase
SSC	= Standard-Saline-Citrat
t	= Translokation
T	= Thymin
#	= Nummer

1. EINLEITUNG

Mehr als 400 Menschen fallen pro Tag malignen Erkrankungen zum Opfer (Wagner, 1985). Will man diesen malignen Neoplasien Einhalt gebieten, so muß man zunächst ihre kausale und formale Pathogenese verstehen. Pathohistologisch werden Tumoren aufgrund ihrer Morphologie typisiert und klassifiziert, immunologisch lassen sich bei einigen Neoplasien spezifisch Antigene nachweisen, serologisch sind möglicherweise bestimmte Tumor-Produkte erfaßbar, und molekulargenetisch können in einigen Fällen Aberrationen in der Expression von Onkogenen gezeigt werden. Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung von Tumoren bietet die cytogenetische Analyse. Die Chromosomen-Analyse kann über den Phänotyp hinaus erste Aufschlüsse über gröbere strukturelle Veränderungen im Genotyp einer Zelle geben. Gleichzeitig stellen Chromosomen die kleinste Einheit der Zelle dar, die lichtmikroskopisch bei geeigneter Färbung mit dem menschlichen Auge noch beurteilt werden kann.

Die Cytogenetik entwickelte sich als Wissenschaftszweig im Laufe dieses Jahrhunderts. Die exakte Chromosomenzahl des Menschen ist erst seit 1956 bekannt (Tjio und Levan, 1956). Eine genaue Zuordnung der einzelnen Chromosomen wurde jedoch erst nach Entdeckung der Chromosomenbanden (Caspersson et al., 1970; Sumner, 1971) und ihrer Hervorhebung durch die Trypsin-Giemsa-Technik (Perry und Wolff, 1974; Yunis, 1976) ermöglicht.

Eine der ersten charakteristischen Chromosomen-Aberrationen in Tumorzellen, die entdeckt wurden, war das Philadelphia-Chromosom, eine balancierte Translokation der Chromosomen # 9 und # 22, bei der chronischen myeloischen Leukämie (Nowell und Hungerford, 1960). Inzwischen wurden in 95 % aller untersuchten Tumoren unterschiedlicher Or-

gane chromosomale Aberrationen gefunden (Chorazy, 1985). Einige Beispiele sind die Deletion am kurzen Arm des Chromosoms # 3 beim kleinzelligen Bronchial-Carcinom (Falor 1985), der Verlust eines Chromosoms # 22 beim Meningeom (Zankel und Zang, 1980) oder die Translokation der Chromosomen # 3 und # 11 beim hereditären Nieren-Carcinom (Hossfeld 1985).

Numerische und strukturelle Chromosomen-Aberrationen können u.a. durch chemische Carcinogene hervorgerufen werden. 1973 wurde aufgrund experimenteller Beobachtungen durch Ames et al. die Behauptung formuliert "Carcinogens are mutagens". In der vorliegenden Arbeit wurde das Carcinogen Diethylnitrosamin (DENA) verwendet, um die Transformation von Leberzellen der Ratte zu initiieren. Wie schon 1958 von L. Foulds beschrieben, vollzieht sich die Cancerogenese in mehreren Stufen, wobei Initiation, Promotion und Progression als wichtigste Teilschritte betrachtet werden können. Die Initiation von Leberzellen kann durch ein genotoxisches Cancerogen, wie DENA, erreicht werden, welches durch Addukt-Bildung eines elektrophilen Reaktions-Produktes an der DNS zu strukturellen Veränderungen führen kann. Zur Progression kommt es jedoch erst dann, wenn initiierte Zellen, sei es durch protrahierte Carcinogen-Exposition oder durch Einwirkung eines Promotors wie Phenobarbital eine selektive Stimulation erfahren (Williams, 1980; Farber, 1980).

Die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Cancerogenese von Hepatozyten lassen sich morphologisch charakterisieren. Dem Stadium der Initiation, deren Veränderungen an der Zelle morphologisch nicht faßbar sind, folgt die Bildung von Foci mit aberrierender Enzymaktivität. Sie sind bei Induktion durch DENA etwa ab der vierten Woche nach Carcinogen-Exposition nachweisbar. Histologisch handelt es sich um scharf begrenzte Hepatozyten-Populationen von ab-

normer Zellgröße, die insgesamt die Größe eines Leberläppchens nicht überschreiten und zu keiner Kompression des umliegenden Leberparenchyms führen. Das Cytoplasma der Zellen ist klar, acidophil, vakuolisiert, oder basophil (Bannasch, 1976). Die Zellen dieser Foci zeichnen sich durch besondere metabolische und enzymatische Eigenschaften aus, wie Verlust der Eisenspeicherungsfähigkeit, Glycogenanreicherung, ATPase- und Glucose-6- Phosphatase-Defekt, sowie Gamma-Glutamyl-Transferase-Positivität (90 - 95 %) (Farber 1980). Die entstandenen Foci können sich phänotypisch zurückbilden, in ihrer Form persistieren oder in ihrem Wachstum fortschreiten, d.h. in das Stadium der Progression übergehen. In diesem Fall entwickeln sich aus den Foci sog. neoplastische Noduli, die ein ganzes oder mehrere Leberlobuli einnehmen können. Die Zellgröße ist variabel, die Kerne sind vergrößert und hyperchromatisch mit deutlichen Nucleoli. Die Kompression des umliegenden Gewebes weist auf ein erhöhtes Wachstumspotential der Noduli hin. Man findet eine gesteigerte DNS-Synthese und erhöhte Mitoserate. In neoplastischen Noduli können auch ohne weitere Carcinogen-Exposition Carcinome entstehen.

Im Gegensatz zu normalen Hepatozyten sind Zellen aus hyperplastischen Foci unter bestimmten Bedingungen in der Lage, in vitro zu proliferieren, ohne daß sie weitere typische Merkmale neoplastischer Zellen aufweisen (Laishes et al. 1978). Diese Eigenschaft scheint auf die hier untersuchte Zell-Linie CL 8244 zuzutreffen. Während Zellen von Foci und hyperplastischen Noduli nicht transplantierbar sind, rufen neoplastische Zellen nach Transplantation Tumorwachstum hervor (Williams et al., 1977). Diese Bedingung erfüllt die zweite, hier untersuchte Zell-Linie CL 8238-42. Es ließe sich daraus folgern, daß sich diese beiden Zell-Linien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Carcinogenese befinden.

Die cytogenetische Analyse dieser Zell-Linien zielt darauf

ab, Aufschluß darüber zu erhalten, ob sich bestimmte chromosomale Aberrationen unterschiedlicher Entwicklungsstufen der hepatozellulären Carcinogenese zuordnen lassen.

Zur Erkennung chromosomaler Aberrationen ist der Vergleich mit dem normalen Karyotyp des gleichen Individuums erforderlich. Dazu wurden Karyogramme aus normalen Hepatozyten der Ratte nach Proliferationsreiz durch PH, Colchizin-Applikation und Zellisolation mittels Collagenase-Perfusion erstellt.

Durch chromosomale Verlagerungen, wie sie bei den untersuchten Zell-Linien gefunden wurden, können Gene aktiviert werden, die an der Zelltransformation beteiligt sind, wie etwa Onkogene. Ein wichtiges Beispiele ist die 8,14-Translokation beim Burkitt-Lymphom des Menschen und die 12,15-Translokation beim Plasmozytom der Maus (Klein, 1981).

Während hierbei die Lokalisation des betreffenden Onkogens auf dem Chromosom entscheidend ist, könnte bei der Aktivierung von Onkogenen durch mutagene Substanzen der Zeitpunkt der Replikation dieses Onkogens eine Rolle spielen. Die Feststellung einer erhöhten Transformations-Sensitivität von Hepatozyten in der frühen S-Phase ließe eine Koinzidenz mit dem Replikationszeitpunkt eines für die Transformation wichtigen Onkogens vermuten. Um dieser Frage näherzukommen, wurde ein Modell für die Zuordnung des zeitlichen Replikationsmusters zu bestimmten Chromosomenabschnitten entworfen und am Beispiel des Chromosoms # 1 bei der Ratte demonstriert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Karyotyp normaler, adulter Hepatozyten der Ratte

2.1.1. Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche Wistarratten (AF/Han) (*Rattus norvegicus*) mit einem Gewicht von 180 - 200g. Bei normalem Licht-Dunkel-Rhythmus erhielten die Tiere eine Altromin-R-Standarddiät (Fa. Lippe, Lage) und Wasser ad libitum.

2.1.2. Partielle Hepatektomie (PH)

Die Zweidrittel-Resektion der Leber wurde nach der von Higgins und Anderson (1931) beschriebenen Methode in Ethernarkose durchgeführt.

Da das Leberparenchym zu den stabilen Geweben zählt, ist dieser Proliferationsreiz erforderlich, um Zellen in der Mitosephase gewinnen zu können.

2.1.3. Colchizin-Injektion

Colchizin zerstört die Mikrotubuli, aus denen der Spindel-Apparat aufgebaut ist und bewirkt dadurch eine Arretierung der Zellen in der Mitosephase (Bowman und Rand, 1968; Eigsti und Dustin, 1954). Colchizin (Serva Nr. 17431) wurde 24 h nach PH, bzw. bei den Tieren, die eine Hydroxyharnstoff(HU)-Infusion (2.2.1.) erhielten, 7 h nach Aufhebung des HU-Blocks i.p. injiziert (Abb.2 B,C). Zu diesem Zeitpunkt haben die ersten Zellen die S-Phase beendet und treten in die G2- und Mitosephase ein. Um Mitosen der frühen

Metaphase zu erhalten, wurde, unter Verzicht auf eine größere Ausbeute von Mitosen, dieser frühe Zeitpunkt gewählt.

Der Eintritt der Hepatozyten in die S-Phase erfolgt ab der 15. h nach PH oder nach Aufhebung des HU-Blocks. Nach PH ohne HU-Infusion verläuft die DNS-Synthese der Leberzellen nicht synchron. Die DNS-Syntheseaktivität beginnt in der Peripherie der Leberlobuli und setzt sich von dort nach perivenös fort (Rabes und Tuzek, 1970). Durch eine HU-Infusion können die Leberzellen am G1-S-Übergang synchronisiert werden. Die anschließende S-Phase wird dabei verkürzt (Rabes et al., 1977). Das Colchizin wurde daher bei vorausgegangener HU-Infusion bereits 7 h nach Beginn der S-Phase injiziert, nach PH ohne eine HU-Infusion 8 h nach dem errechneten Beginn der S-Phase.

Die ermittelten Zeitpunkte basieren auf verschiedenen ausführlichen Arbeiten über die Proliferationskinetik der Leberzellen nach PH und HU-Infusion (Rabes et al., 1977; Rabes, 1976; Iseler, 1977).

Die Colchizin-Dosis betrug 170 µg/kg KG. Dies entspricht 10 % der LD50 bei i.v. und i.p. Applikation (Spector, 1956). Um den Colchizin-Spiegel im Blut aufrecht zu erhalten, wurde zweimal die Hälfte dieser Dosis im Abstand von 2 h injiziert.

Am histologischen Schnitt wurde der Effekt einer Erhöhung der Colchizin-Dosis um das 1,5-fache auf Morphologie und Mitosezahl geprüft.

2.1.4. Collagenase-Perfusion der Leber

In eigenen Versuchen konnte bei Chromosomen-Präparation direkt aus mechanisch zerkleinertem, regenerierendem Lebergewebe kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Die Chromosomen waren auch bei Einhaltung einer Temperaturdifferenz zwischen Zellsuspension und Auftropffläche unzureichend gespreitet, und der Mitoseindex betrug nur 0,1 %.

Um eine bessere Einzelzellsuspension und damit anschließend eine gute Spreitung der Mitosen zu erhalten, wurde die Methode der Leber-Perfusion modifiziert nach Seglen (1972) eingesetzt. Die Perfusion wurde 4 h nach der ersten Colchizin-Applikation durchgeführt (Abb.2B). Die Narkose erfolgte durch i.p.-Injektion von Nembutal (5mg/100g KG, Abbott S.A. Scientific Parc Nr. 8612). Der Abdominalraum wurde durch Y-Schnitt eröffnet, und die Vena cava inf., sowie die Vena portae wurden freigelegt. Nach Inzision der Vena portae wurde die Kanüle am peripheren Ende des zuführenden Infusionsschlauches eingeführt und die Vena cava inferior ligiert.

Um die Leber blutfrei zu spülen, wurden zur Vorperfusion 100 ml Ca^{++} - und Mg^{++} -freie Hanks-Lösung (Anhang 1) unter Zusatz von 1000 IE Heparin (Thrombophob, Nordmark-Werke) verwendet. Die Vorperfusion hat außerdem den Effekt, daß ein Ca^{++} -abhängiger Leber-Adhäsions-Faktor, der mit dem zentralen Plaque-Material der Desmosomen identisch ist, in seiner Funktion beeinträchtigt wird, so daß die Hemi-Desmosomen auseinanderweichen (Modjanova und Malenkov, 1973). Sobald die Leber ihre gelblich-braune Eigenfarbe zeigte, wurde der Thorax eröffnet und durch Kanülierung der Vena cava sup. über das rechte Atrium ein Abfluß geschaffen.

Die eigentliche Perfusion erfolgte mit Collagenase-halti-

ger Hanks-Lösung. In 100 ml Ca^{++} -haltiger Hanks-Lösung wurden 20mg Collagenase Typ IV (370 Units/mg, Sigma Nr. 5138) gelöst. Collagenase führt Protocollagen-Moleküle in lösliche Spalt-Produkte über. Calcium wirkt als Enzymaktivator. Bei Zugabe des Chelatbildners EGTA (Titriplex VI, Merck Art. 8435) wird Collagenase völlig inaktiviert (Seglen, 1972).

Bei der Vorperfusion wurden über eine Dauer von 10 min 9 ml/min infundiert. Die Collagenase-Perfusion lief über 15-30 min mit 5-7,5 ml/min. Das Perfusat des Efflux wurde rezirkuliert.

Collagenase entwickelt ihr Aktivitätsoptimum bei pH 7,3. Um dieses pH aufrecht zu erhalten, wurde die Perfusions-Lösung mit HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure) (Merck Art. 10110) gepuffert. Zur Temperierung des Perfusats wurde der Infusionsschlauch in mehreren Windungen durch ein auf 37 °C erwärmtes Wasserbad geführt. Über einen seitlichen Zugang wurden die Perfusions-Lösungen mit Sauerstoff angereichert. Der schematische Aufbau der Apparatur ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Die Collagenase-Perfusion wurde beendet, sobald das Leberparenchym eine weiche Konsistenz erhielt und die Kapsel begann, sich blasig abzuheben. Dieser Zustand wurde nach einer durchschnittlichen Perfusionszeit von 30 min (einschließlich Vorperfusion) erreicht.

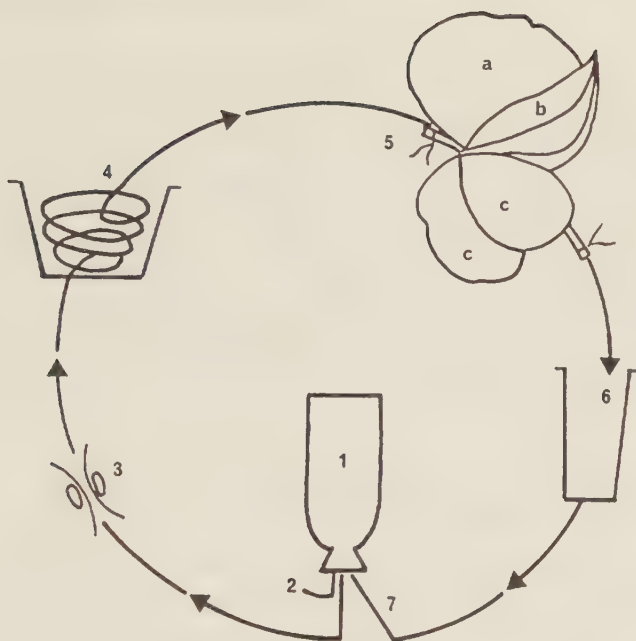


Abb.1: Schematischer Aufbau der Perfusions-Apparatur

- 1 Perfusions-Lösung
- 2 O₂-Zufuhr
- 3 Regler für Tropfgeschwindigkeit
- 4 Spirale des Perfusionsschlauches im Thermostat
- 5 Leber: verbliebene Lappen
nach partieller Hepatektomie:
a) Lobus dexter
b) Lobus caudatus
c) Lobuli papillares
- 6 Auffanggefäß
- 7 Kanüle zur Rezirkulation

2.1.5. Präparation der Leberzellen nach Perfusion

Nach Entnahme der Leberlappen und Abziehen der Kapsel in Leber-Medium (Anhang 4) bei 4 °C wurden die Leberzellen in Collagenase-Lösung suspendiert und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch vierfache Gaze in silikonisierte Spitzgläser filtriert, 5 min mit max. 40g (Beckmann-Zentrifuge T3-6 Rotor TH-4) bei 4 °C abzentrifugiert und mit Leber-Medium gewaschen.

Ein Tropfen der Leberzellsuspension wurde auf einen Objektträger aufgetropft und durch Anfärbung mit Trypanblau der Anteil vitaler Zellen festgestellt (Paul, 1980).

2.1.6. Chromosomen-Präparation

Nach erneutem Zentrifugieren wurde im Reagenzröhrchen ein Überstand vom zweifachen Volumen des Sediments belassen und tropfenweise das hypotone Medium, eine 0,075 M KCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Art. 4936) zugegeben, in der die Zellen 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurden. Die Fixierung erfolgte im ersten Schritt mit einem Chloroformhaltigen Ethanol-Essigsäure-Gemisch (3 T. Chloroform, 1 T. Essigsäure, 6 T. 100% Ethanol) für 15 min und im zweiten Schritt mit reinem Ethanol-Essigsäure-Gemisch (3 T. Ethanol und 1 T. Essigsäure) für 20 min bei Raumtemperatur (Dutrillaux und Couturier, 1983; Moorehead et al., 1960). Die Zell-Suspension wurde schließlich auf entfettete, bei 4 °C in Aqua dest. gekühlte Objektträger aus ca. 30 cm Höhe aufgetropft und die Spreitung durch Luftstrom begünstigt.

2.1.7. Trypsin-Giemsa-Färbung

Die Chromosomenfärbung der perfundierten Leberzellen erfolgte mit 4%iger Giemsa-Lösung in Sörensen-Phosphat-Puffer pH 6,8 über 10 min. Eine Vorbehandlung mit Trypsin, wie unter 2.2.5 für Chromosomen der kultivierten Zell-Linie beschrieben, war für die Chromosomen aus Zellen perfundierter Leber nicht in gleicher Weise anwendbar, da sie auf Trypsin-Behandlung viel empfindlicher reagieren. Die Trypsinkonzentration mußte daher bei einer Einwirkungszeit von 1 min auf 0,0125 % reduziert werden.

2.2. Darstellung des Replikationsmusters des Chromosoms # 1 nach Hydroxyharnstoff-Synchronisation in vivo.

2.2.1. Hydroxyharnstoff-Infusion

Will man nicht nur die Chromosomen aus den Zellen der perfundierten Leber präparieren, sondern zusätzlich eine ³H-TdR-Markierung zu einem definierten Zeitpunkt der DNS-Synthesephase vornehmen, so besteht die Möglichkeit, durch eine vorgeschaltete Hydroxyharnstoff (HU)-Infusion die Leberzellen am G1/S-Übergang zu blockieren und zu synchronisieren (Iseler, 1977). Hydroxyharnstoff hemmt das Enzym Ribonucleosiddiphosphat-Reductase, welches die Umwandlung der Ribonucleosiddiphosphate in Desoxyribonucleosiddiphosphate katalysiert. Hierdurch wird die DNS-Synthese der Zellen blockiert.

Die Tiere erhielten von der 14. - 24. h nach PH über die Schwanzvene eine Dauerinfusion von 1,25 mM HU/kg/h in 0,9 %iger NaCl-Lösung (Abb. 2C). Die durch einen Perfusor

(Braun Melsungen) geregelte Infusionsgeschwindigkeit betrug 0,56 ml/h. 24 h nach PH wurde die HU-Infusion beendet. Zu diesem Zeitpunkt hat ein großer Anteil der zur Proliferation stimulierten Leberzellen den G_1/S -Übergang erreicht.

Die Enzym-Hemmung durch HU ist reversibel. Nach Aufhebung des HU-Blocks treten die Zellen synchronisiert in die S-Phase ein.

Die Kontroll-Tiere erhielten keine HU-Infusion.

2.2.2. 3H -Thymidin-Markierung der Chromosomen in der frühen S-Phase

Die Injektion von (Methyl- 3H)-Thymidin (3H -TdR) (Radiochemical Centre, Amersham, England) wurde zu Beginn der S-Phase, 1 h nach Beendigung der HU-Infusion bzw. bei den Kontroll-Tieren 17 h nach PH, vorgenommen (Abb.2C,D). Die Dosis betrug 0,8 μCi (29,6 kBq)/g KG bei einer spezifischen Aktivität von 83 Ci (3,1 TBq)/mmol.

Das Tritium-markierte Thymidin wird über den Salvage-Pathway in die DNS eingebaut. 3H -TdR ist ca. 20 min im Blut verfügbar. Die Markierung erfolgt somit nur in der frühen S-Phase. Nach Chromosomen-Präparation (2.1.6.) und Autoradiographie (2.2.3.) konnten die markierten DNS-Bereiche auf den Chromosomen aufgefunden und bestimmten Abschnitten zugeordnet werden (2.3.).

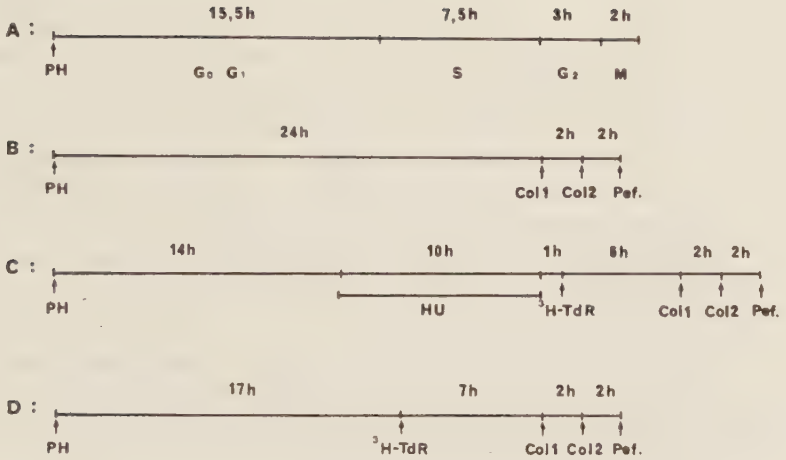


Abb.2: Zeitliche Schemata der Versuchsanordnung in vivo (Col = Colchizin, Perf = Perfusion)

- A: Schema des Leberzellzyklus nach PH.
Die Zeitangaben beziehen sich auf die ersten Zellen, die jeweils in den folgenden Zellzyklus eintreten.
- B: Schema für die Chromosomen-Präparation nach PH.
- C: Schema für die ³H-TdR-Markierung nach vorausgegangener HU-Synchronisation.
Die S-Phase ist nach HU-Gabe verkürzt.
- D: Schema des Kontroll-Versuchs mit ³H-TdR-Markierung, ohne vorausgegangene HU-Infusion.

2.2.3. Autoradiographie

Emulsion (Ilford K2) und Aqua dest. wurden in einem Wasserbad bei 42 °C 1 h getrennt erwärmt und dann im Verhältnis 1:1 v/v vorsichtig in eine Küvette gemischt und weiter im 42 °C Wasserbad belassen. Um eine Background-Entwicklung zu vermeiden, wurden die Präparate ohne Berührung der Küvettenwand in die verdünnte Emulsion eingetaucht. Danach wurden die Präparate bei Raumtemperatur und einer Luftfeuchtigkeit von 65 % 2 h liegend getrocknet.

Die Expositionsdauer unter völligem Lichtschutz mit Silicagel bei 4 °C betrug 26 Tage, die Entwicklungszeit mit frisch angesetzter Entwickler-Lösung (Anhang 2) 12 min, die Fixierung (Anhang 3) 30 min.

Die Behandlung der Präparate von Leberzellen mit und ohne HU-Synchronisation erfolgte parallel in einem Arbeitsgang.

2.2.4. Photographie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden am inversen Kamera-Mikroskop ICM 405 (Zeiss, Oberkochen) unter Verwendung eines Interferenz-Grünfilters (Best.-Nr. 467806) und eines Agfa-Ortho 25-Films bei 1000-facher Vergrößerung angefertigt. Die Trypsin-Giemsa-gefärbten Chromosomen-Präparate wurden photographisch dokumentiert und dabei die Position des Objektträgers an den Koordinaten am Kreutztisch des Mikroskops abgelesen und notiert.

Vor der Autoradiographie mußten die Präparate in 70 %igem Ethanol entfärbt werden, da die Giemsa-Farbe in der Emulsion ausfällt. Nach Entwicklung und Fixierung (2.2.3) der Präparate wurden sie erneut mit Giemsa-Lösung, jedoch ohne Trypsinvorbehandlung (2.1.7.), angefärbt und dieselben

Mitosen mit Hilfe der zuvor notierten Koordinaten als Autoradiographie erneut photographiert.

2.3. Auswertung

Zur Auswertung wurden die Chromosomen aus den photographischen Abzügen ausgeschnitten und nach dem Muster des standardisierten Karyotyps von *Rattus norvegicus* (Abb. 11) Levan, 1974) geordnet. Die Chromosomen sind auf den Photographien um einen Faktor vom $2-5 \times 10^3$ vergrößert.

- Von den Tieren, bei denen weder eine HU-Infusion noch eine ^3H -TdR-Markierung vorgenommen worden war (Abb. 2B), wurde der normale Karyotyp dargestellt.
- Bei den Tieren, die mit (Abb. 2D) oder ohne (Abb. 2C) vorausgegangene HU-Infusion eine ^3H -TdR-Injektion in der frühen S-Phase erhalten hatten, wurde die Dichte der Markierung in den sechs Banden-Bereichen des Chromosoms # 1 ausgezählt, um das Replikationsmuster zu ermitteln.

Zur eindeutigen Identifizierung der durch die Markierung morphologisch teilweise unkenntlich gewordenen Chromosomen wurden die vor der Autoradiographie angefertigten Aufnahmen der Trypsin-Giems-gefärbten Chromosomen zum Vergleich herangezogen (Abb. 3).

- Das Replikationsmuster auf den Chromosomen der Tiere, die eine HU-Infusion erhalten hatten und der Tiere, deren Leberzellen nicht durch HU synchronisiert waren, wurden verglichen.

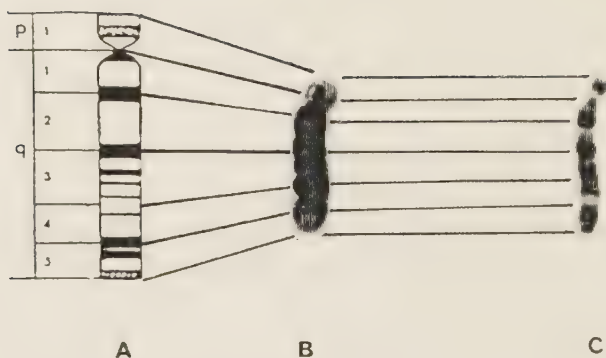


Abb.3: Zuordnung der Silbergranula zu bestimmten Abschnitten des Chromosoms # 1

- A = Schematisches Chromosom # 1 mit einem Abschnitt auf dem kurzen Arm p und fünf Abschnitten auf dem langen Arm q.
- B = Chromosom # 1 mit Silbergranula nach Autoradiographie
- C = Chromosom # 1 mit Banden durch Trypsin-Giemsa-Färbung vor der Autoradiographie.

2.4. Karyotyp praeneoplastischer und neoplastischer Leberzellen.

2.4.1. Herkunft und Kultur der Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42

Die untersuchten Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 stammen aus der Leber von männlichen Wistar AF/Han-Ratten. Die Tiere hatten bei einem Anfangsgewicht von 100 g das Carcinogen Diethylnitrosamin in einer Dosis von 5 mg / kg KG / die (Rabes et al. 1972) über eine Dauer von 64 (CL 8244) bzw. 56 (CL 8238-42) Tagen im Trinkwasser erhalten.

Am histologischen Schnitt sind nach diesem Zeitintervall praeneoplastische Herde als Enzym-Defekt-Bezirke nachweisbar.

Die Zell-Linien wurden vom R. Kerler aus in vivo initiierten praeneoplastischen Populationen der Leber gewonnen und als permanente Linien gehalten. Für die zytogenetischen Untersuchungen wurden diese Zellkulturen zur Verfügung gestellt. Die Methoden der Isolierung und Propagierung wurden bereits beschrieben (Kerler und Rabes 1986) und sollen hier nur zusammenfassend dargestellt werden.

Die Leberzellen wurden durch Collagenase-Perfusion isoliert und nach weiteren Aufarbeitungsschritten in einer Dichte von 10^4 Zellen / ml Leber-Medium mit 10% fötalem Kälber-Serum (FKS) in Plastikflaschen (Falcon) eingesät.

Mit steigendem Wachstumspotential der Zellen konnte das Medium vereinfacht werden: ab der 7. Passage (21. Woche) wurde im Lauf von 10 Wochen das Leber-Medium mit 10 % FKS schrittweise auf das einfachere MEM (Earle) (Boehringer, Mannheim 21 000 5) mit 5 % Kälber-Serum umgestellt.

Während normale, adulte Hepatozyten in diesem Medium nicht wachstumsfähig sind, sind transformierte Leberzellen in

der Lage zu proliferieren. Nach einigen Wochen werden sie mittels Öse aus der Primär-Kultur entnommen und weiter-propagiert.

Während die Zell-Linie CL 8244 (Abb. 4) lediglich als Monolayer mit Kontaktinhibition wächst, zeigt die Zell-Linie CL 8238-42 (Abb. 5) ein charakteristisches Tumorzellverhalten, wie Clonierbarkeit in Softagar, Bildung multizellulärer Spharoiden in Suspensionskultur und Tumorigenität auf thymusaplastischen Nacktmäusen (2.4.2, 3.3.1).

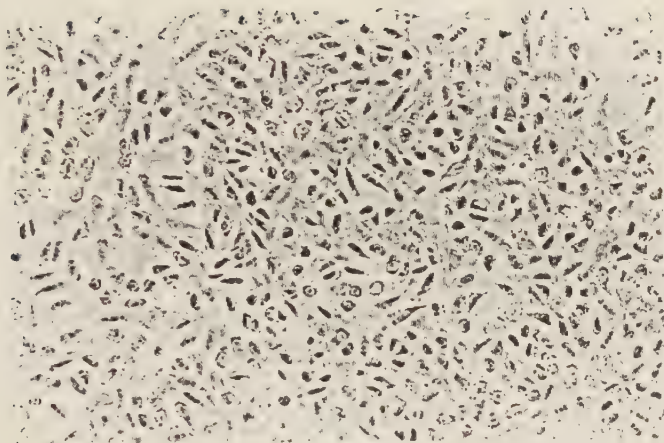


Abb.4: Kultur der Zell-Linie CL 8244 in der 18. Passage (Vergr. x 100)

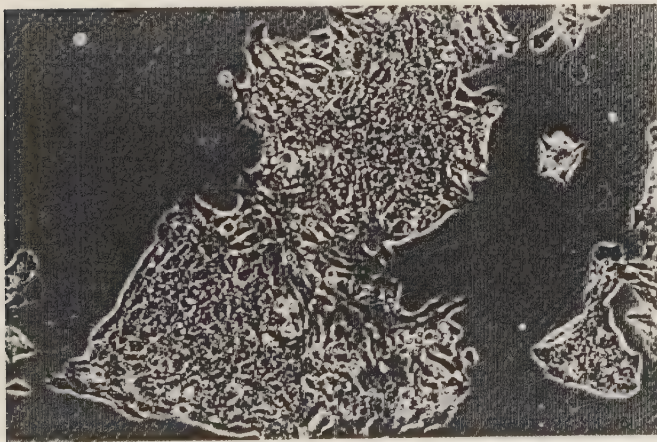


Abb.5: Kultur der Zell-Linie CL 8238-42 in der 32. Passage (Vergr. x 100)

2.4.2. Tumorigenitäts-Prüfung auf der Nacktmaus

Zur Prüfung auf Tumorigenität wurden die Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 auf je drei thymusaplastische Swiss-Nunu Nacktmäuse überimpft. Die Tiere wurden in Laminar Flow Sterilkäfiggestellen gehalten.

Zur Injektion wurden die Zellen in den Kulturflaschen, nach Abpipettieren des Mediums abtrypsiniert (0,025 % Trypsin (1:250 Difco Nr. 0152-15) + 0,0125 % EDTA (Serva 38190) in Ca^{++} und Mg^{++} freier Hanks-Lösung), 5 min mit 40 g (Labofuge I Heraeus Christ) zentrifugiert und zweimal mit CMF- Hanks (Tab.1) gewaschen. Am Coulter Counter (Model ZBI, Coulter Electronics) wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt.

Pro Tier wurden 10^6 Zellen in 0,5 ml physiologischer Lösung intraperitoneal injiziert.

2.4.3. Kultur der Zell-Linie CL 8238-42 nach in vivo-Passagierung

Die Zell-Linie CL 8238-42 führte nach i.p. -Injektion auf die Nacktmaus zur Tumorbildung (3.3.1.). Um den Karyotyp der neugebildeten Tumorzellen mit den injizierten Zellen der Linie CL 8238-42 vergleichen zu können, wurde der Tumor wieder in Kultur genommen. Das Tumorgewebe wurde aus dem Abdominalraum der Maus steril entnommen, in Ca^{++} und Mg^{++} -freiem Hanks (Anhang 1) gespült und mit der Schere grob zerkleinert. Zur weiteren Auflösung wurden die Gewebestückchen in 0,05%ige, sterilfiltrierte Collagenase-Lösung aufgenommen und 2 1/2 h unter Schütteln bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abzentrifugieren und Waschen in Leber-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (Anhang 4) wurde die Zellsuspension, in Plastikflaschen (Falcon) mit

4,5 ml des gleichen Mediums eingesät. Nach einer Kulturzeit von 10 Tagen wurden aus den Zellen Chromosomen präpariert.

2.4.4. Chromosomen-Präparation

Zur Chromosomen-Präparation wurde den Zellen in Kultur zunächst 0,4 µg Colchizin pro 1 ml Medium für die Dauer von 1 h zugesetzt. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert (2.4.2.) und die Trypsinaktivität durch Zugabe serumhaltigen Mediums abgestoppt. Die Chromosomen-Präparation aus den kultivierten Zell-Linien wurde in der gleichen Weise durchgeführt, wie unter 2.1.6. für die Leberzellen, die durch Perfusion gewonnen wurden, beschrieben.

Der Einfluß einer erhöhten Colchizin-Dosis auf die Mitoserate wurde geprüft: Die Ausgangsdosis von 0,4 µg/ml Medium wurde um das 10-fache, auf 4 µg/ml Medium erhöht. Außerdem wurde der Anteil der Mitosen in der Prophase in Abhängigkeit von der Colchizin-Expositionsdauer von 1, 2 und 3 h an je 100 Mitosen untersucht. Da sich die Chromosomen während der Mitose-Phase zunehmend verkürzen, wurde die Länge der Chromosomen als Parameter für das Stadium in der Mitose-Phase verwendet.

2.4.5. Trypsin-Giemsa-Färbung

Nach Anfärben der Präparate mit Giemsa-Lösung können die Mitosen im Lichtmikroskop betrachtet werden. Um jedoch die einzelnen Chromosomen einer Mitose identifizieren zu können, müssen die charakteristischen Banden jedes Chromosoms durch eine enzymatische Behandlung mit Trypsin hervorgehoben werden:

Drei Tage nach dem Auftropfen wurden die Präparate mit

einer 0,025 %igen Trypsin-Lösung (1:250 Difco Nr. 0152-15) in PBS-Puffer pH 7 (Anhang 5), 1-3 min bei Raumtemperatur behandelt, in PBS-Puffer 15 sec gespült, dann 15 min in frisch filtrierter 1,5 %iger Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt Art. 9204) in Sörensen-Phosphat-Puffer pH 6,8 (Anhang 6) gefärbt, 5 sec in Aqua dest. gespült und luftgetrocknet (Ötzkinay und Mitelman, 1979, Seabright, 1971). Die exakte Einwirkungszeit der Trypsin-Lösung läßt sich schwer standardisieren, da sie von der Art des Zellmaterials, dem Alter der Präparate (Austrocknung!), der Luftfeuchtigkeit und Lufttemperatur abhängt. Es muß daher immer eine Probefärbung vorausgehen.

2.4.6. BrdU-Acridinorange-Färbung

Die Chromosomen der Zell-Linie CL 8238-42 wurden zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch dargestellt:

6,5 h vor Abbruch der Kultur wurden 5 µg 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) (Serva 15240) pro 1 ml Medium zugegeben. Die Präparate wurden nach dem Auftropfen mindestens 12 h bei 4 °C aufbewahrt, anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe geführt, in Aqua dest. gespült, in einer 0,05 % Acridinorange-Lösung (Serva Nr. 46005) in Sörensen-Phosphat-Puffer pH 6,7 5 min gefärbt, nochmals in Aqua dest. gespült, mit Puffer eingedeckt und für 1 - 2 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen (Meer et al. 1972).

BrdU wird an Stelle von Thymidin in die DNS der Chromosomen eingebaut. Der Farbstoff Acridinorange lagert sich an die nicht durch BrdU substituierten DNS-Abschnitte an. Die frühreplizierenden Banden sollen dadurch zur Darstellung kommen.

2.5. Darstellung des Replikationsmusters des Chromosoms # 1 nach Hydroxyharnstoff-Synchronisation in vitro

2.5.1. Hydroxyharnstoff-Synchronisation

Zur Synchronisation wurde der Kultur der Zell-Linien CL 8244 1 μ Mol Hydroxyharnstoff (HU) (Serva 25435) pro 1 ml Medium über eine Dauer von 16 h (Abb.6) beigegeben. Während dieses Zeitraums haben die Zellen den G_1 -S-Übergang erreicht (Rabes et al., 1977).

12 h vor Beendigung der Kultur durch Abtrypsinieren der Zellen bzw. 30 min vor der radioaktiven Markierung wurde der HU-Block durch Mediumwechsel aufgehoben (Abb.6). Die Zellen können dann synchronisiert in die S-Phase eintreten, und es ist zum Zeitpunkt der Colchizin-Gabe nach weiteren 9,5 h eine hohe Mitoserate zu erwarten.

2.5.2. ^3H -Thymidin-Markierung

Nach Aufhebung des HU-Blocks, zu Beginn der S-Phase, wurde der Zellkultur nach einem Intervall von 30 min 1 μ Ci (37 KBq) (Methyl- ^3H) Thymidin (^3H -TdR) mit der spezifischen Aktivität von 87 Ci (3,2 TBq)/mMol (Radiochemical Centre, Amersham, England) angeboten (Abb.6). Um eine möglichst punktuelle Markierung zu erzielen, wurde das ^3H -TdR nach 1 min wieder durch Mediumwechsel entfernt.

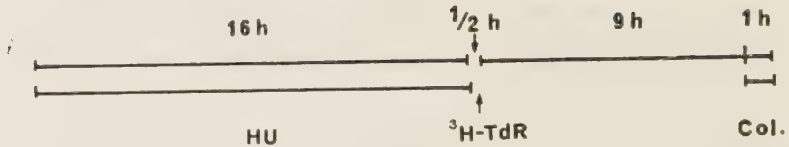


Abb.6: Zeitliches Schema der Versuchsanordnung in vitro

HU = Hydroxyharnstoff
³H-TdR = (Methyl-³H)-Thymidin
Col = Colchizin

2.5.3. Autoradiographie

Die Autoradiographie wurde entsprechend der bei 2.2.3. beschriebenen Methode durchgeführt. Die Expositions-Dauer betrug für die Zell-Linien aus der Kultur nur 9 Tage.

2.5.4. Photographie

Von den Trypsin-Giemsa gefärbten Präparaten wurden vor und nach der Autoradiographie an dem inversen Kamera-Mikroskop ICM (Zeiss, Oberkochen) unter den bei 2.2.4. genannten photographischen Bedingungen Aufnahmen angefertigt. Die fluoreszenz-gefärbten Präparate wurden am Orthoplan-Leitz-Mikroskop der Abteilung für pädiatrische Genetik und prä-natale Diagnostik der Universität München (Leiter: Prof. Dr. J. Murken) unter Verwendung eines IC-Filters, eines Fluotar-Objektives x100 und eines Kodak Ektachrome EPY 135-36-Films aufgenommen.

2.6. Auswertung

Zur Chromosomen-Analyse der Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 wurden die Chromosomen aus den angefertigten photographischen Abzügen ausgeschnitten und in Anlehnung an eine Vorlage des standardisierten Karyotyps von *Rattus Norvegicus* (Abb.11) (Levan, 1974) sortiert.

- Von der Zell-Linie CL 8244 wurden in der 18. Passage 30 Karyogramme erstellt. Bei dieser praeneoplastischen Zell-Linie wurden Translokationen, Deletionen, Trisomien und fehlende Chromosomen registriert und die Häufigkeit ihres Auftretens bestimmt.
- Zur Verlaufs-Kontrolle wurden die 5., 18. und 36. Passage der Zell-Linie 8244 auf strukturelle und numerische Aberrationen überprüft. In je 50 Mitosen wurde die Anzahl der Chromosomen ausgezählt.
- Von der Zell-Linie CL 8238-42 wurden insgesamt 20 Karyogramme in der 1., 12., 15., 24. und 36. Passage erstellt und auf Aberrationen untersucht. Nach Tumorexstirpation der beimpften Nacktmaus und erneuter Kultur der Leber-Carcinomzellen wurde der Karyotyp erneut bestimmt und mit dem ersten verglichen. Die Anzahl der Chromosomen wurde in je 50 Mitosen der 1., 24. und 36. Passage ausgezählt.
- Die Ermittlung des Replikationsmusters erfolgte an 56 Mitosen der Zell-Linie CL 8244. Die Silbergranula wurden jeweils den sechs Abschnitten des Chromosoms # 1 zugeordnet (Abb. 3).

3. ERGEBNISSE

3.1. Wirkung der Colchizin-Dosis und -Expositionszeit auf die Darstellung von Chromosomen

Die Gewinnung von Chromosomen gelingt in vivo, und auch in vitro durch Applikation des Spindelgiftes Colchizin. Alle Zellen, die während der Colchizinexposition die Mitosephase durchlaufen, werden im Stadium der Metaphase arretiert, so daß die Chromosomen präpariert werden können.

Ist die Konzentration des Colchizins zu gering, so laufen die Zellen durch die Mitose-Phase hindurch, ist die Konzentration zu hoch, werden die Chromosomen geschädigt. Doch nicht nur die Konzentration, sondern auch die Einwirkungszeit des Colchizins hat einen Einfluß auf die Morphologie der Chromosomen.

In vivo wurden zwei verschiedene Dosen und in vitro 3 unterschiedliche Expositionszeiten untersucht.

3.1.1. Untersuchung der Colchizin-Dosis in vivo

Der Einfluß der Colchizin-Dosis auf Mitoseindex und Morphologie wurde in vivo an der Ratte untersucht. Tier A erhielt nach einer Zweidrittel-Resektion der Leber, die übliche Colchizin-Dosis von 170 µg/kg KG. Tier B erhielt die 1,5-fache Dosis von 255 µg/kg KG. Die Expositionszeit betrug jeweils 4 h (2.1.3.). Für jeden nach der Zweidrittel-Resektion verbliebenen Leberlappen wurden die Mitosen am histologischen Schnitt in je 30 Gesichtsfeldern bei einer 400-fachen Vergrößerung gezählt.

Es ergibt sich, daß die Erhöhung der Dosis um das 1,5-fache eine Erhöhung des Mitoseindex um mehr als das 4-fache bewirkt (Tab.1). Eine Abhängigkeit des Mitosindex von der

Lokalisation in einem bestimmten Lobus scheint nicht gegeben, denn bei Tier A ist der relativ höchste Mitoseindex in den Processus papillares, bei Tier B im Lobus dexter zu finden (Tab.1).

Die Betrachtung der Mitosefiguren im histologischen Schnitt zeigt deutliche Unterschiede zwischen Tier A und Tier B. Bei Tier A sind morphologisch intakte Mitosefiguren erkennbar (Abb.7), während bei Tier B die Chromosomen in den Mitosen verklumpt wirken (Abb.8).

Diese Ergebnisse müssen unter dem Vorbehalt gewertet werden, daß bei der geringen Zahl untersuchter Tiere möglicherweise auch individuelle Streuungen das Ergebnis beeinflussen.

Tab.1:

Mitoseindex nach Zweidrittel-Resektion der Leber in verschiedenen Lappen nach Injektion von 170 µg/kg KG Colchizin (Tier A) oder 255 µg/kg KG Colchizin (Tier B).

Tier A:

Leberlobus	Hepatoz. (n)	Mitosen(n)	Mitoseindex (%)
Lobus dexter	5000	11	0,22
Lobus caudatus	5111	23	0,45
Processus papillares	5090	28	0,55
Ges. Rest-leber nach PH	15201	62	0,41

Tier B:

Leberlobus	Hepatoz. (n)	Mitosen(n)	Mitoseindex (%)
Lobus dexter	5106	121	2,37
Lobus caudatus	5088	87	1,71
Processus papillares	5108	71	1,39
Ges. Rest-leber nach PH	15302	279	1,82

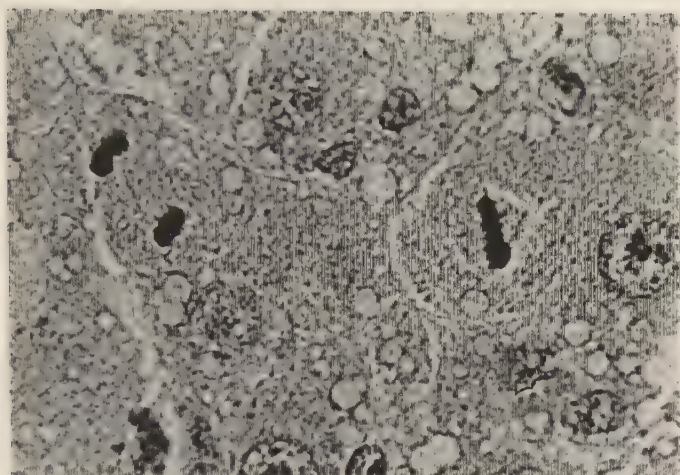


Abb.7: Morphologisch intakte Mitosefiguren in Hepatozyten nach Injektion von 170 µg/kg KG Colchizin- (Vergr. x 1000)

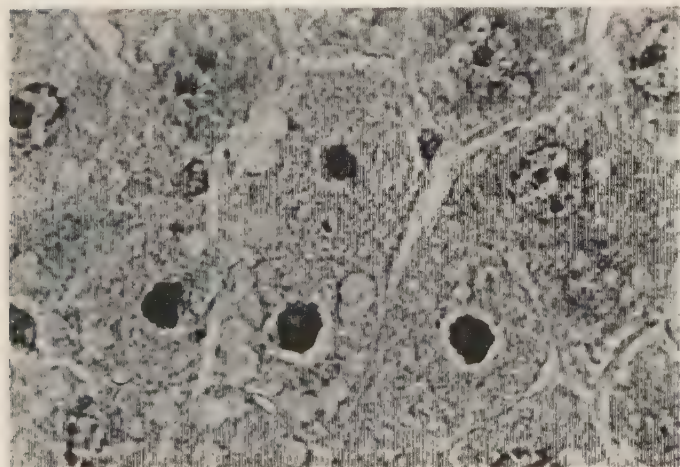


Abb.8: Verklumpt wirkende Mitosen in Hepatozyten nach Colchizin-Injektion von 255 µg/kg KG (Vergr. x 1000)

3.1.2. Colchizin-Dosis und -Expositionszeit in vitro

In vitro wurde am Beispiel der Zell-Linie CL 8244 der Einfluß der Colchizin-Dosis und unterschiedlicher Expositionszeiten auf den Mitoseindex und die Morphologie der Chromosomen untersucht.

Eine 10-fache Erhöhung der Colchizin-Konzentration ergab keine Erhöhung des Mitoseindex.

Die Variation der Expositions-Dauer hatte dagegen einen deutlichen Einfluß auf den Anteil von Mitosen eines bestimmten Stadiums der Mitose-Phase. Nach Expositions-Dauer von 1,2 oder 3 Stunden wurden die Chromosomen von je 100 Mitosen auf ihre Länge hin betrachtet. Es wurden 5 Stadien innerhalb der Mitose-Phase unterschieden:

1. P = Prophase (Chromosomen noch schwach kondensiert, so daß sie miteinander verknäult und nicht einzeln abgrenzbar sind).
2. Mf = frühe Metaphase (Länge des Chromosoms # 1: $> 7\mu\text{m}$)
3. Mm = mittlere Metaphase
(Länge des Chromosoms # 1: $5-7\mu\text{m}$)
4. Ms = späte Metaphase (Länge des Chromosoms # 1: $< 5\mu\text{m}$)
5. Ch = Chromatiden-Spaltung (als Zeichen der Vorbereitung für die Anaphase).

Zur Erstellung eines Karyogramms sind möglichst lange Chromosomen, auf denen die Banden deutlich unterscheidbar sind, erwünscht. Der größte Anteil von frühen Metaphasen mit entsprechend längeren Chromosomen wurde bei der einstündigen Expositions-Dauer erzielt (Tab. 2., Abb.9).

Tab.2: Prozentanteil der Mitosen in verschiedenen Stadien der Mitosephase, in Abhängigkeit von der Colchizin-Expositions-Dauer von 1, 2 und 3 Stunden in jeweils 100 ausgezählten Mitosen.

Colchizin-Expositions-dauer	Prophase P	frühe MT	mittlere Mm	späte Ms	Chromatiden Ch
1 h	10	35	40	5	10
2 h	5	10	45	25	15
3 h	5	10	10	35	40

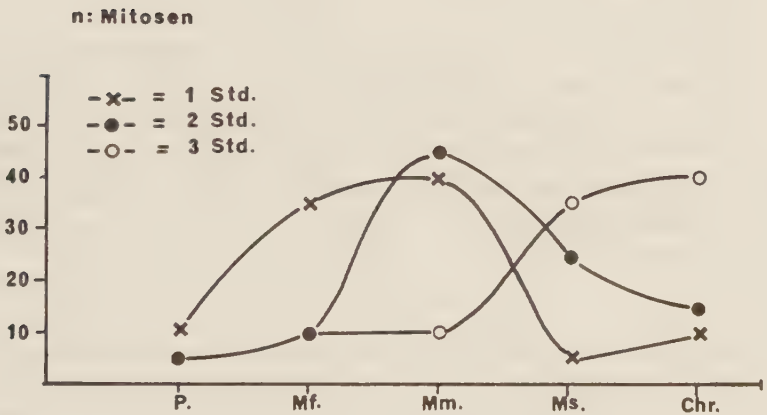


Abb.9: Graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 8

3.2. Präparationstechnik und Darstellung des Karyotyps normaler, adulter Hepatozyten von *Rattus norvegicus*

Zunächst sollten die Chromosomen aus normalen Leberzellen der Ratte isoliert und dargestellt werden, um sie dann mit Chromosomen der praeneo- und neoplastischen Zell-Linien vergleichen zu können. Der normale Karyotyp von *Rattus norvegicus* ist bereits aus Kulturen von Lymphozyten (Ver-nole et al., 1984), Fibroblasten (Schnedl, 1972) und embryonalen Zellen (Levan, 1974) bekannt.

Die Bänderung der Chromosomen scheint in allen Zelltypen identisch zu sein. Es werden jedoch in Abhängigkeit von dem jeweiligen Zelltyp unterschiedliche Gene auf den Chromosomen aktiviert. In Hinblick auf die Erstellung von Replikationsmustern und weiterführende molekulargenetische Untersuchungen an Hepatozyten kommt der Isolierung von Chromosomen aus Leberzellen Bedeutung zu.

Zur Gewinnung der Chromosomen aus Leberzellen wurde die Technik der Collagenase-Perfusion und der Direktpräparation angewendet. Es ist allgemein bekannt, daß die Qualität von Chromosomen aus Nativgewebe nicht der von Chromosomen aus kultivierten Zellen entsprechen kann (Granberg-Öhman et al, 1982; Spooner et al. 1972; Smeets et al. 1985).

3.2.1. Gewinnung der Chromosomen aus normalen Hepatozyten der Ratte.

Die Wahl des richtigen Zeitpunktes für die Perfusion ist problematisch. Bei der individuellen Streuung der Tiere kann selbst bei genauer Kenntnis der durchschnittlichen Zellzyklus-Zeiten der optimale Zeitpunkt für die Perfusion verfehlt werden. Dies wurde durch Auszählen von Mitosen an histologischen Schnitten gleichbehandelter Tiere bestätigt.

Eine gleichmäßige, alle Bereiche des Leberparenchyms umfassende Perfusion ist von entscheidender Wichtigkeit. Eine zu langsame Vorperfusion führt zur Thrombenbildung, eine zu rasche Collagenase-Perfusion zur Druckbelastung der Leberzellen. Beides beeinträchtigt die Qualität der Hepatozyten.

Der Vitalitätsindex durch Trypan-Ausschlußfärbung (Paul, 1980) liegt selten über 50 %. In erster Linie muß dafür die Vorschädigung des Leberparenchyms durch PH, HU und Colchizin verantwortlich gemacht werden. Denn bei einer Perfusion ohne diese Vorbelastung beträgt der Vitalitätsindex meistens 90 %. Im Zuge der verstärkten Proliferation nach PH tritt in den Leberzellen eine feintropfige Verfettung auf, die durch HU verstärkt wird (Schmidkonz et al., 1977). Die durch Colchizin in der Mitose arretierten Zellen sind offenbar besonders vulnerabel.

Bei einwandfreier Perfusion der Leber betrug der Mitoseindex der aufgetropften Präparate 1 %. Nach HU-Synchronisation wurde kein höherer Mitoseindex erzielt. Die Mitosen waren ausreichend gespreitet, 72 % der Mitosen waren tetraploid (Abb.10).



Abb.10: Tetraploide Mitosen aus Hepatozyten der Ratte nach Collagenase-Perfusion und Direktpräparation; Trypsin-Giemsa-gefärbt.

3.2.2. Darstellung des Karyotyps von *Rattus norvegicus* aus normalen Hepatozyten

Gut gespreitete Mitosen, die aus normalen Leberzellen nach Perfusion gewonnen wurden, lassen die Erkennung des typischen Karyotyps von *Rattus norvegicus* mit seinen 42 Chromosomen einschließlich des X- und des Y-Chromosoms zu.

Nach den aus der Literatur bekannten Daten (Levan, 1974; Schnedl, 1972) sind bei der Ratte nach Lage des Zentromers 10 akrozentrische, 4 subtelozentrische und 7 metazentrische Chromosomen-Paare zu unterscheiden. Nach Konvention der Cytogenetiker werden die Chromosomen in der Weise sortiert, daß der kürzere Arm p vom Zentromer aus nach oben, der längere Arm q nach unten gerichtet ist (Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclatur, 1978). Zu den akrozentrischen Chromosomen, ohne ein p gehören die Chromosomen # 2,4-10, X und Y. Bei subtelozentrischen Chromosomen, wie den Chromosomen # 1,3, 11 und 12 ist das p kleiner als das q. Bei metazentrischen Chromosomen sind p und q etwa gleichlang, wie bei den Chromosomen # 13-20.

Nach dem standardisierten Karyotyp (Abb.11) sind alle Chromosomen der Größe nach geordnet, zunächst die akro- und subtelozentrischen, dann die metazentrischen Chromosomen.

Eine Ausnahme bilden die subtelozentrischen Chromosomen # 11 und 12, die einigen größeren metazentrischen Chromosomen vorangestellt sind, um sie zusammen mit den anderen akro- und subtelozentrischen Chromosomen zu gruppieren. Die Gonosomen X und Y werden gesondert aufgeführt.

Bei der Direkt-Präparation nach Perfusion ragen die Chromosomen # 1 und 2 als die deutlich längsten heraus, wobei das Chromosom # 1 jedoch subtelozentrisch und das Chromo-

som # 2 akrozentrisch ist. Die Chromosomen # 3 und 12 sind an den Satelliten erkennbar, wobei Chromosom # 3 wesentlich größer ist als Chromosom # 12. Alle anderen Chromosomen können teilweise nur der Größe nach geordnet werden.

Eine genaue Identifizierung der Chromosomen ist nur durch eine Banden-Färbung möglich. Die Banden-Färbung nach der Trypsin-Giemsa-Technik (2.1.7.) läßt sich bei diesen Chromosomen, die durch Perfusion gewonnen wurden, jedoch nicht in gleicher Weise durchführen wie bei Chromosomen kultivierter Zellen. Auch bei einer Erniedrigung der Trypsinkonzentration auf 0,012 % und einer Verkürzung der Einwirkungszeit auf 10 sec treten die Banden nicht so deutlich wie auf Chromosomen aus kultivierter Zellen hervor (Abb. 10, 11).

Die alternative Möglichkeit der Banden-Färbung nach Hitze-Denaturierung in SSCx2 (0,3 M NaCl, 0,03M Trinatriumcitrat) über 1/2 - 2 h bei 60 °C führt ebenfalls nicht zur Darstellung optimal gebänderter Chromosomen.



Abb.11: Schema des standardisierten Karyotyps von *Rattus norvegicus* (Levan, 1984). Darunter Karyogramm der nach Collagenase-Perfusion und Direktpräparation gewonnenen und Trypsin-Giemsa gefärbten Chromosomen aus normalen, adulten Hepatozyten der Ratte.

3.3. Tumorigenitäts-Prüfung und Darstellung der Karyotypen praeneoplastischer und neoplastischer Leberzellen nach in vitro-Passagierung.

Nach Darstellung des normalen Karyotyps von *Rattus norvegicus*, sollte der Karyotyp der praeneoplastischen Zell-Linie CL 8244 und der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42 untersucht und mit dem normalen Karyotyp verglichen werden.

Die Tumorigenität beider Linien wurde durch i.p.-Injektion auf die Nacktmaus geprüft. Nach Tumorbildung wurde an erneut in vitro gehaltenen Zellen der Karyotyp wiederum untersucht und mit dem der Ursprungslinie verglichen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich der Karyotyp von Tumorzellen unter in vitro-Bedingungen verändert. Es wäre daher erstrebenswert, auch die Chromosomen praeneo- bzw. neoplastischer Hepatozyten direkt aus der Leber zu präparieren. Auf weitere Sicht wird sich vielleicht durch die Technik der Perfusion, in Kombination mit spezifischen Markern oder besonderen Selektionsverfahren, die Möglichkeit erschließen, Chromosomen auch aus nativen Lebertumorzellen zu isolieren. Vorläufig mußte jedoch für die cytogenetische Untersuchung praeneoplastischer und neoplastischer Leberzellen der Umweg über die Zellkultur genommen werden.

3.3.1. Tumorigenitäts-Prüfung der Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 auf der Nacktmaus.

Sowohl die Zell-Linie CL 8244 als auch die Zell-Linie CL 8238-42 wurden zur Tumorigenitäts-Prüfung auf Nacktmäuse überimpft (2.4.2.).

Die Zell-Linie CL 8244 führte bis 10 Wochen nach i.p.-Injektion nicht zur Tumorbildung. Auch der Laparatomie-Befund war negativ.

Die Tiere, die eine Injektion der CL 8238-42-Zellen erhalten hatten, zeigten ab der zweiten Woche eine deutliche Tumorbildung. Bei der Sektion fand sich ein den gesamten Peritonealraum auskleidender Tumor von weicher Konsistenz, begleitet von hämorrhagischem Aszites. Der Tumor wuchs infiltrativ in die Muskulatur des Diaphragmas (Abb.13).

Histologisch handelte es sich um ein differenziertes hepatozelluläres Carcinom (Abb.12). Die gut abgegrenzten Tumorknoten zeigen ein uniformes Bild von hepatozytenähnlichen Zellen mit Aufhebung der Läppchenstruktur. Das Tumorgewebe ist von hämorrhagischen Nekrosen durchsetzt. Die Zellkerne weisen eine Polymorphie auf, sind zur Peripherie der Tumorknoten hin pyknotisch und ihre Nucleoli sind deutlich sichtbar. Mitosen sind vermehrt.

Mikroskopisch waren bei einem von insgesamt 9 Tieren Metastasen nachweisbar. Die Metastasen waren in der Lunge (Abb.14) subpleural und im Caecum submucös lokalisiert.

Nach dem Wachstumsverhalten der Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 in vitro (2.4.1.) und dem Ergebnis der Testung der Tumorigenität im Retransplantations-Versuch auf die Nacktmaus wurde für die weiteren Analysen angenommen, daß die Linie CL 8244 praeneoplastische, die Linie CL 8238-42 dagegen neoplastische Eigenschaften repräsentiert.

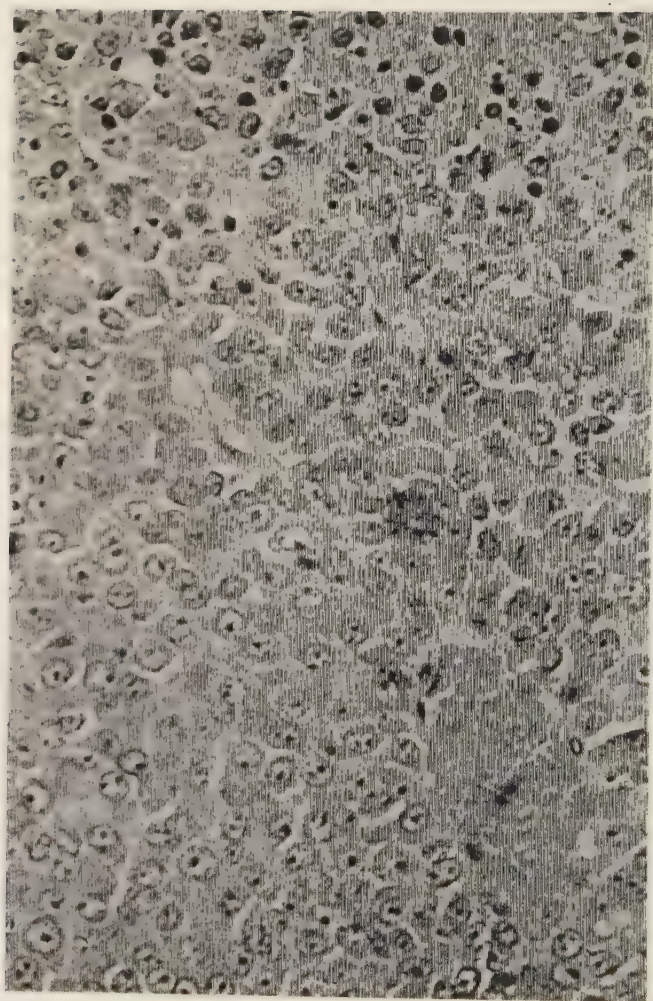


Abb.12: Gut differenziertes hepatozelluläres Carcinom nach i.p.-Injektion der Zell-Linie CL 8238-42 auf die Nacktmaus (Vergr. x 400).



Abb.13: Infiltration des Tumors in das Diaphragma
(Vergr. x 250)



Abb.14: Metastase des Tumors in der Lunge
(Vergr. x 250)

3.3.2. Chromosomen-Aberrationen im Karyotyp der praeneoplastischen Zell-Linie CL 8244

Von der praeneoplastischen Zell-Linie CL 8244 wurde die 5., 18. und 39. Passage untersucht. Nach Banden-Färbung mit der Trypsin-Giemsa-Technik (2.4.5.) wurden von der 18. Passage 30 Karyotypen zur Chromosomen-Analyse erstellt. Drei typische Aberrationen traten in 100 % aller untersuchten Mitosen auf: eine Deletion des Chromosoms # 1, eine Trisomie des Chromosoms # 2 und eine Translokation des Chromosoms # 3 mit dem Chromosom # 14.

Die Deletion des Chromosoms # 1 ist interstitiell. Sie betrifft den langen Arm mit den Bruchstellen bei q42 und q36 (del (1) (q36q42)) (Abb.15a).

Das Chromosom # 2 liegt nicht, wie normal, paarig vor, sondern in 3-facher Ausführung (+2) (Abb.15b).

Bei der 3,14-Translokation verbinden sich der lange Arm des Chromosoms # 3 mit dem langen Arm des Chromosoms # 14. Die Bruchstelle auf dem Chromosom # 3 liegt bei q12, auf dem Chromosom Nr. 14 bei q21 ((13q12; 14q21)) (Abb.15c). Das terminale Ende des Chromosoms # 14 geht dabei verloren, während das akrozentrische Fragment des Chromosoms # 3 (+) in einigen Fällen noch vorhanden ist.

In 77 % der untersuchten Mitosen ist das Chromosom # 11 in unterschiedlicher Weise verändert. Es ist transloziert, deletiert oder fehlt (Abb.15d).

Weitere Aberrationen traten mit geringerer Häufigkeit auf. Eine Übersicht gibt Tab. 3.

Drei Karyogramme der Zell-Linie CL8244 sind auf den Abbildungen 16, 17 und 18 dargestellt.

Die aufgeführten chromosomalen Aberrationen waren bereits in der 5. Passage zu erkennen und sind auch in der 39. Passage noch nachweisbar.

Tab.3: Zell-Linie CL 8244: Prozentuale Häufigkeit der chromosomalen Aberrationen in 30 Karyogrammen

Aberrationen	Häufigkeit (%)
del 1	100
+ 2	100
t (3;14)	100
- 11	30
del 11	26
rob (11;?)	20
- 7	23
- 16-20	20
- 9	17
- 10	17
t 16-20	17
- 4	13
- X	13
- 5	6
- 13	6
t (4;15)	6
- 8	6
- 3	3
- 12	3
- 15	3
t (7;?)	3
rob (8,10)	3
t (9;4)	3
t (10;14)	3

Nomenklatur:

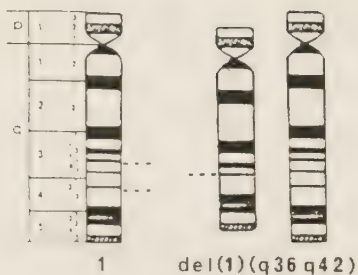
del = Deletion

t = Translokation

+ = ein zusätzliches Chromosom bzw. Trisomie

- = ein fehlendes Chromosom

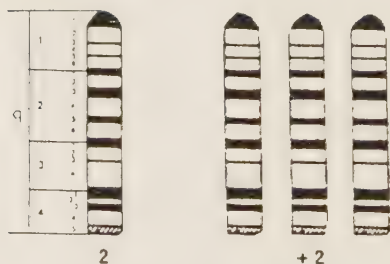
rob = Robertson'sche Translokation



z.B.:



Abb.15a: Zell-Linie CL 8244: Interstitielle Deletion des Chromosoms # 1 (del(1)(q36q42))



z.B.:

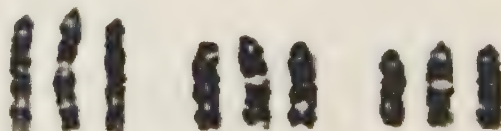
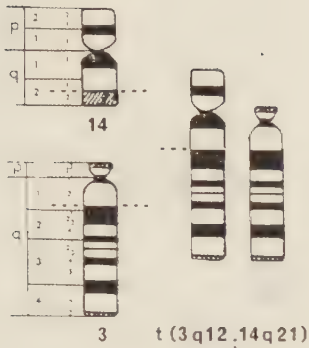


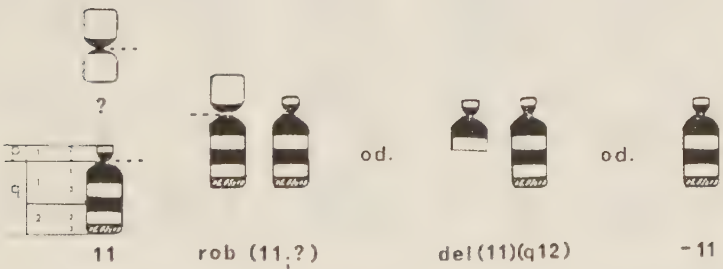
Abb.15b: Zell-Linie CL 8244: Trisomie des Chromosoms # 2 (+2).



z.B.:



Abb.15c: Zell-Linie CL 8244, Translokation der Chromosomen # 3 und # 14.



z.B.:



Abb.15d: Zell-Linie CL 8244; Robertson'sche Translokation (rob (11;?)), Deletion (del (11)(q12)) und Monosomie (-11) des Chromosoms # 11.



Abb.16: Karyogramm der Zell-Linie CL 8244. (18. Pass.) A = Deletion des Chromosoms # 1, B = Trisomie des Chromosoms # 2, C = Translokation der Chromosomen # 3 und # 14, D = Robertson'sche Translokation des Chromosoms # 11.



Abb.17: Karyogramm der Zell-Linie CL 8244. (10. Pass.) A = Deletion des Chromosoms # 1, B = Trisomie des Chromosoms # 2, C = Translokation der Chromosomen # 3 und # 14, D = Deletion des Chromosoms # 11.

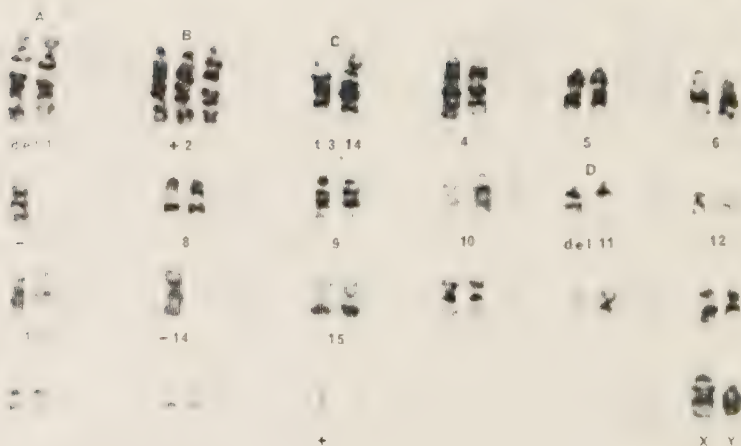


Abb. 18: Karyogramm der Zell-Linie CL 8244. (18. Pass.) A = Deletion des Chromosoms # 1, B = Trisomie des Chromosoms # 2, C = Translokation der Chromosomen # 3 und # 14, D = Deletion des Chromosoms # 11.

3.3.3. Chromosomenzahl der praeneoplastischen Zell-Linie
CL 8244

In jeweils 50 Mitosen der 5., 18. und 39. Passage wurden die Chromosomen gezählt. Die dem normalen Karyotyp entsprechende Zahl von 42 Chromosomen liegt in der 5. Passage zu 76 %, in der 18. Passage zu 52 % und in der 39. Passage nur noch zu 32 % vor (Abb.19). Mit zunehmender Passagezeit weicht die Chromosomenzahl somit vom normalen Karyotyp ab.

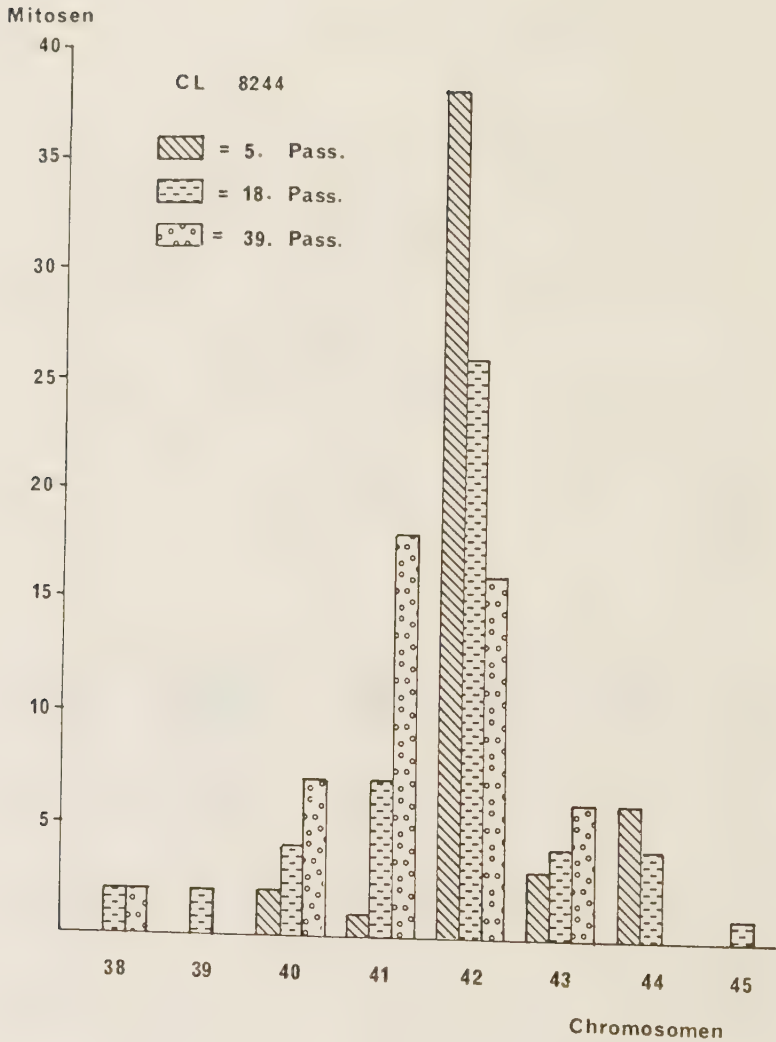


Abb.19: Zell-Linie CL 8244: Chromosomenzahl pro Mitose in der 5., 18. und 39. Passage. Ergebnis der Auszählung von 50 Mitosen je Passage.

3.3.4. Chromosomen-Aberrationen im Karyotyp der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42

Von unterschiedlichen Passagen (1., 12., 15., 24., 36.) der Zell-Linie CL 8238-42 wurden 20 Karyogramme angefertigt, die charakteristische Aberrationen zeigen (Abb. 21, 22, 23).

Das Chromosom # 3 ist in 100 % viermal vorhanden, wobei an einem oder zwei dieser Chromosomen am terminalen Ende eine Bruchstelle bei der Bande q42, q41 oder q35 zu erkennen ist (Abb. 20a).

Weitere Chromosomen liegen in mehrfacher Kopie vor: das Chromosom # 7 in 85 % 3-4 mal (Abb. 20b), das Chromosom # 12 in 100 % 3-4 mal, das Chromosom # 9 in 55 % 3 mal.

In 65 % besteht auch eine Trisomie des Chromosoms # 11, wobei meist ein Chromosom normal ist, während die beiden anderen eine Robertson'sche Translokation mit zwei Chromosomenfragmenten unterschiedlicher Größe aufweisen; die translozierten Chromosomenbruchstücke lassen sich nicht sicher identifizierten (Abb. 20c).

Auffällig ist in 100 % ein akrozentrisches Marker-Chromosom, welches sich keinem Chromosom des normalen Karyotyps zuordnen läßt. Seine Größe entspricht der des Chromosoms # 6, und es wird durch zwei deutlich, weit auseinanderliegende Banden gekennzeichnet, zwischen denen ein homogener, kaum angefärbter Bereich liegt (Abb. 20d). Es ist nicht auszuschließen, daß es sich hierbei um eine sog. homogeneously staining region (HSR) handelt.

In Tab. 4 sind die genannten häufigen Aberrationen zusammen mit weiteren, die seltener auftraten, zusammengefaßt.

Tab. 4: Zell-Linie CL 8238-42 prozentuale Häufigkeit der chromosomalen Aberrationen in 20 Karyogrammen

Aberrationen	Häufigkeit (%)
mark	100
+(+) 12	100
++ 3	100
del 3	100
rob (11;?)	95
+(+) 7	85
+ 11	65
+ 9	55
- 5	35
- 10	10
rob (10;?)	10
del 4	10
del, t (1;?)	5
del 5	5
t (5;8)	5
rob (6,7)	5
rob (7,10)	5
- 8	5
del 10	5
t (mark, ?)	5

Nomenklatur:

mark = Marker-Chromosom
+ = ein zusätzliches Chromosom bzw. Trisomie
++ = zwei zusätzliche Chromosomen bzw. Quatrosomie
- = ein fehlendes Chromosom
del = Deletion
rob = Robertson'sche Translokation
t = Translokation
? = nicht identifizierbares Chromosomenfragment

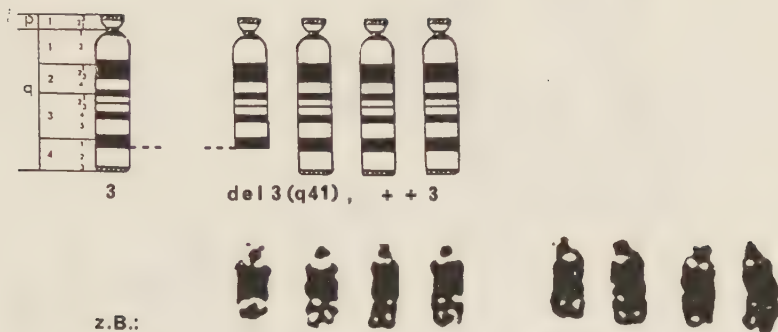


Abb.20a: Zell-Linie CL 8238-42: Quatrosomie des Chromosoms # 3 (++3) mit Deletion eines Chromosoms # 3 (del(q41))

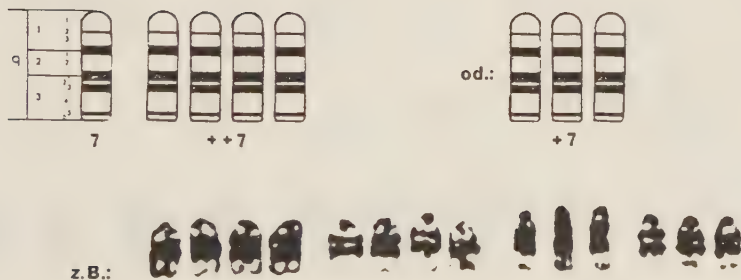


Abb.20b: Zell-Linie CL 8238-42: Quatrosomie des Chromosoms # 7 (++7) oder Trisomie des Chromosoms # 7 (+7).

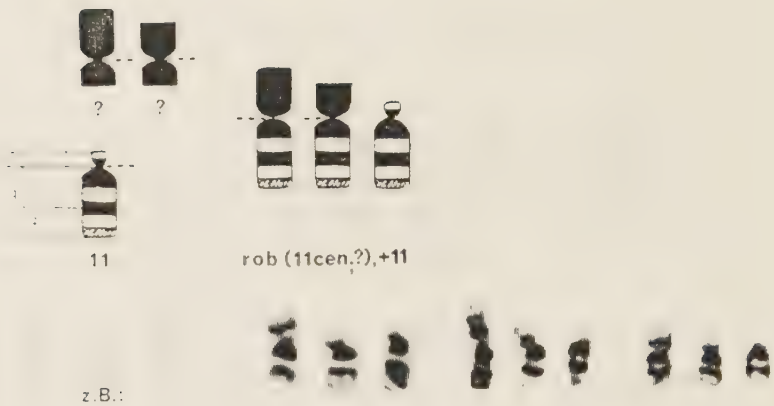


Abb. 19c: Zell-Linie CL 8238-42: Robertson'sche Translokation des Chromosoms # 11 mit unterschiedlich großem Fragment eines nicht identifizierbaren Chromosoms.



mark



Abb. 19d: Zell-Linie CL 8238-42: Marker-Chromosom mit hellem Bereich bzw. fraglicher HSR zwischen zwei dunklen Bändern.



Abb.21: Karyogramm der Zell-Linie CL 8238-42 (24. Pass.).
A = Quatrosomie des Chromosoms # 3 mit Deletion, B = Quatrosomie des Chromosoms # 7, C = Trisomie und Robertson'sche Translokation des Chromosoms # 11, D = Trisomie des Chromosoms # 12, E = Marker-Chromosom.



Abb.22: Karyogramm der Zell-Linie CL 8238-42 (12. Pass.).
A = Quatrosomie des Chromosoms # 3 mit Deletion zweier Chromosomen # 3, B = Trisomie des Chromosoms # 7, C = Trisomie des Chromosoms # 9, D = Trisomie und Robertson'sche Translokation des Chromosoms # 11, E = Quatrosomie des Chromosoms # 12, F = Marker-Chromosom.



Abb.23: Karyogramm der Zell-Linie CI 8238-42 (24. Pass.). A = Quatrosomie des Chromosoms # 3 mit Deletion zweier Chromosomen # 3, B = Trisomie des Chromosoms # 7, C = Trisomie des Chromosoms # 9, D = Trisomie und Roberson'sche Translokation des Chromosoms # 11, E = Quatrosomie des Chromosoms # 12, F = Marker-Chromosom.

3.3.5 Chromosomenzahl der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42

Als durchschnittliche Chromosomenzahl der Zell-Linie CL 8238-42 ergaben sich in der 1. und 24. Passage 51, in der 36. Passage nur noch 50 Chromosomen pro Mitose.

Der Median lag in der 1. und 36. Passage bei 49 - 50, in der 24. Passage bei 50 - 51 Chromosomen pro Mitose. Der Modalwert beträgt in allen untersuchten Passagen 52 Chromosomen pro Mitose (Abb. 24).

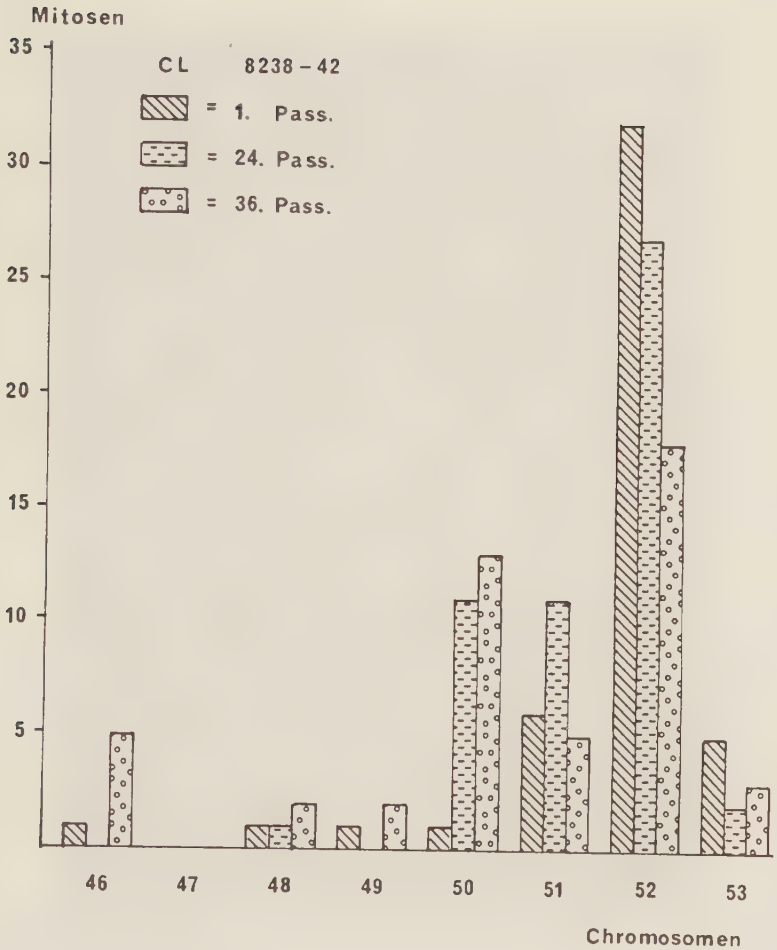


Abb.24: Zell-Linie CL 8238-42: Anzahl der Chromosomen pro Mitose in der 1., 24. und 36. Passage. Ergebnis der Auszählung von 50 Mitosen je Passage.

3.3.6. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zell-Linie CL 8238-42

Die Banden der mit BrdU vorbehandelten und mit Acridinorange gefärbten Chromosomen der Zell-Linie CL 8238-42 sind weniger deutlich (Abb.25). Durch Zusatz von Amethopterin (Methotrexat^R), welches die Mitosen in der Prophase arretiert, wäre es möglich gewesen, längere Chromosomen und damit mehr und deutlichere Banden zu erzielen (Yunis, 1976). Bekanntlich verursacht Amethopterin bei menschlichen Chromosomen Brüche. Um zusätzliche Veränderungen des Karyotyps zu vermeiden, wurde daher auf die Anwendung dieses Cytostatikums vor der Präparation der Chromosomen verzichtet.



Abb.25: Zell-Linie CL 8238-42: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Chromosomen nach Vorbehandlung mit BrdU und Färbung mit Acridinorange.

3.3.7. Karyotyp der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42
nach Passagierung und Tumorbildung in der Nackt-
maus.

Nach i.p.-Injektion der CL 8238-42-Zellen auf die Nackt-
maus wurde Tumorbildung induziert. Nach erneuter Kultivie-
rung der Tumorzellen wurde ein Karyogramm erstellt. Es
zeigten sich die gleichen chromosomalen Aberrationen, wie
vor der in vivo-Passagierung (Abb.26, vergl. Abb. 21, 22,
23).

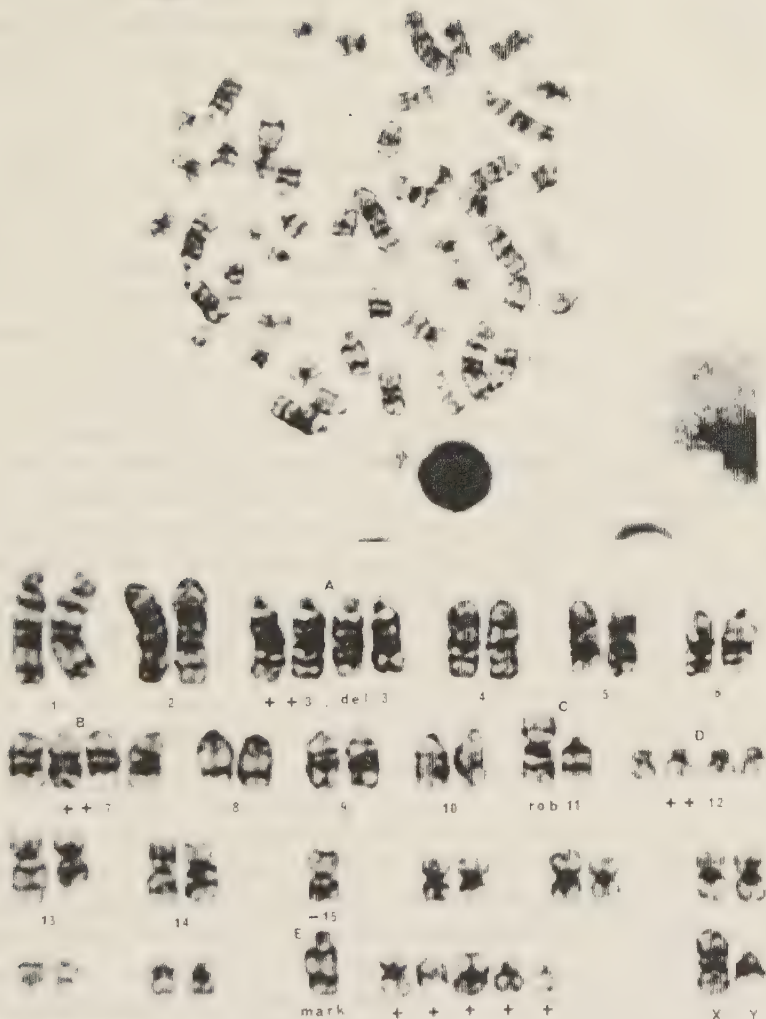


Abb.26: Karyogramm der Zell-Linie CL 8238-42 nach Passagierung in der Nacktmaus. A = Quatrosomie und Deletion des Chromosoms # 3, B = Quatrosomie des Chromosoms # 7, C = Robertson'sche Translokation des Chromosoms # 11, D = Quatrosomie des Chromosoms # 12, E = Marker-Chromosom.

3.4. Ein Modell für die Darstellung des Replikationsmusters der frühen DNS-Synthese-Phase auf Chromosomen normaler Hepatozyten in vivo und praeneoplastischer Hepatozyten in vitro.

Der Karyotyp von Lebertumorzellen weist gegenüber dem normalen Karyotyp der Ratte deutliche Aberrationen auf. Diese morphologisch faßbaren Veränderungen der Chromosomen, wie Trisomien, Translokationen und Deletionen stehen in Beziehung zu molekulargenetischen Ereignissen in der DNS, wie möglicherweise der Aktivierung von Onkogenen (s. 4.2.).

Ziel ist es, diese Onkogene nicht nur auf bestimmten Chromosomenabschnitten zu lokalisieren, sondern ihr Replikationsmuster in definierten Abschnitten der DNS-Synthese-Phase zu erfassen. Hierzu wurde das folgende Versuchsmodell erstellt: in vivo wurde Ratten nach einem Proliferationsreiz durch partielle Hepatektomie und HU-Synchronisation der DNS-Synthese zu einem genau definierten Zeitpunkt in der S-Phase der Hepatozyten $^3\text{H-TdR}$ i.p. injiziert; in vitro wurde die Zell-Linie CL 8244, ebenfalls nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese, in einem kurzen Intervall der S-Phase $^3\text{H-TdR}$ exponiert.

Es ist bekannt, daß in der frühen S-Phase die Transformationssensitivität der Leberzellen durch alkylierende Nitrosoverbindungen erhöht ist. Da Mutationen präferentiell in replizierender DNS auftreten, erscheint eine chromosomale Lokalisation frühreplizierender Abschnitte von besonderem Interesse. Die $^3\text{H-TdR}$ -Markierung erlaubt eine Erkennung früh replizierender Abschnitte auf den Chromosomen. Auf welchen dieser frühreplizierenden Bereiche ein ebenfalls in der frühen S-Phase replizierendes Onkogen liegt, kann nur durch eine spezifische in-situ-Hybridisierung geklärt werden.

Hier sollte jedoch zunächst nur die Methode zur Bestimmung des Replikationsmusters in der frühen S-Phase exemplarisch am Beispiel des Chromosoms # 1 dargestellt werden. In vivo und in vitro-Bedingungen wurden dabei verglichen und der Einfluß des HU auf das Replikationsmuster geprüft.

3.4.1. Replikationsmuster des Chromosoms # 1 normaler Hepatozyten nach Leber-Perfusion

Zur autoradiographischen Darstellung der frühreplizierenden Abschnitte in vivo wurde ^3H -TdR 17 h nach PH (2.2.2.) zu Beginn der S-Phase injiziert. Nach Chromosomenpräparation und Autoradiographie wurden die Silberkörner auf 90 Chromosomen # 1 normaler Hepatozyten gezählt. Bezogen auf die Gesamtkörnerzahl betrug die prozentuale Verteilung der Silberkörner auf dem Abschnitt p1: 8,8 %, auf q1: 7,0 %, auf q2: 10,2 %, auf q3: 24,8 %, auf q4: 26,7 % und auf q5: 22,5 % (Abb. 27a, Tab. 5).

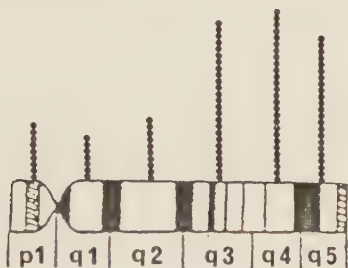
3.4.2. Replikationsmuster des Chromosoms # 1 normaler Hepatozyten nach Leber-Perfusion mit HU-Synchronisation der DNS-Synthese

Zur Untersuchung der frühsynthetisierenden Bereiche des Chromosoms # 1 nach Synchronisation durch eine 10-stündige HU-Infusion wurde die ^3H -TdR-Markierung 30 min nach Aufhebung des HU-Blocks durchgeführt (2.2.1., 2.2.2.). Auf dem Chromosom # 1 54 diploider Hepatozyten wurde die prozentuale Verteilung der Silbergranula pro Chromosomenabschnitt gezählt. Es ergab sich für den Abschnitt p1: 9,7 %, für q1: 7,8 %, für q2: 14,2 %, für q3: 31,4 %, für q4: 23,2 % und für q 5: 13,8 % (Abb. 27b, Tab. 5).

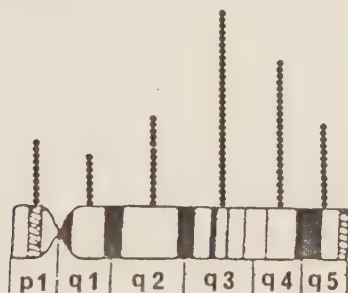
3.4.3. Replikationsmuster des Chromosoms # 1 der prae-neoplastischen Zell-Linie CL 8244 nach HU-Synchronisation.

Zur Markierung der frühen S-Phase in vitro wurde ^3H -TdR 30 min nach Beendigung der HU-Blockierung der Kultur zugegeben (2.5.1., 2.5.2.). Ausgezählt wurden 112 Chromosomen # 1 der Zell-Linie CL 8244. Es zeigte sich auf dem Abschnitt p1 eine prozentuale Verteilung der Silbergranula von 11,7 %, auf q1: 9,2 %, auf q2: 18,4 %, auf q3: 27,1 %, auf q4: 21,1 % und auf q5: 12,6 % (Abb. 27c, Tab. 5).

Abb.27: Prozentuale Verteilung der Silberkörner auf den sechs Banden des Chromosoms # 1 bezogen auf die Gesamtkörnerzahl:



a) aus normalen Hepatozyten, nach Perfusion, ohne vorangegangene HU-Synchronisation.



b) aus normalen Hepatozyten, nach Perfusion mit vorangegangener HU-Synchronisation in vivo.



c) aus praeneoplastischen Zellen der Linie CL 8244 mit vorangegangener HU-Synchronisation in vitro.

Tab.5: Prozentuale Verteilung der Silbergranula pro Chromosomenabschnitt des Chromosoms # 1 in Bezug auf die Gesamtsilberkornzahl pro Chromosomenabschnitt des Chromosoms # 1 in Bezug auf die Gesamtsilberkornzahl (Zahlenwerte in %).

Zelltyp	Abschnitte des Chromosoms # 1					
	p1	q1	q2	q3	q4	q5
Normale Leberzellen nach Collagenase- Perfusion	8,8	7,0	10,2	24,8	26,7	22,5
Normale Leberzellen nach Collagenase- Perfusion und HU- Synchronisation	9,7	7,8	14,2	31,4	23,2	13,8
Zell-Linie CL 8244 nach HU-Synchroni- sation	11,7	9,2	18,4	27,1	21,1	12,6

3.4.4. Vergleich des Replikationsmusters des Chromosoms # 1 in praeneoplastischen und normalen Hepatozyten mit und ohne HU-Synchronisation.

Die zusammenfassende Darstellung des Histogramms (Abb.28) zeigt die Silberkorndichte auf den Banden p1, q1, q2, q3 und q4 des Chromosoms # 1 von HU-synchronisierten Leberzellen in vivo und in vitro, sowie nicht synchronisierten Hepatozyten in vivo.

Nach HU-Synchronisation ist in vivo bei normalen Hepatozyten und in vitro bei praeneoplastischen Leberzellen ein gleichartiges Replikationsmuster auf allen Banden des Chromosoms # 1 nachweisbar. Bei den nicht synchronisierten Hepatozyten in vivo zeigt sich eine Verschiebung der maximalen Silberkorndichte in den distalen Bereich des langen Arms.

Es liegt somit nach HU-Synchronisation zwischen Leberzellen in vivo und in vitro eine größere Übereinstimmung des Replikationsmusters vor, als in vivo zwischen synchronisierten und nicht synchronisierten Hepatozyten.

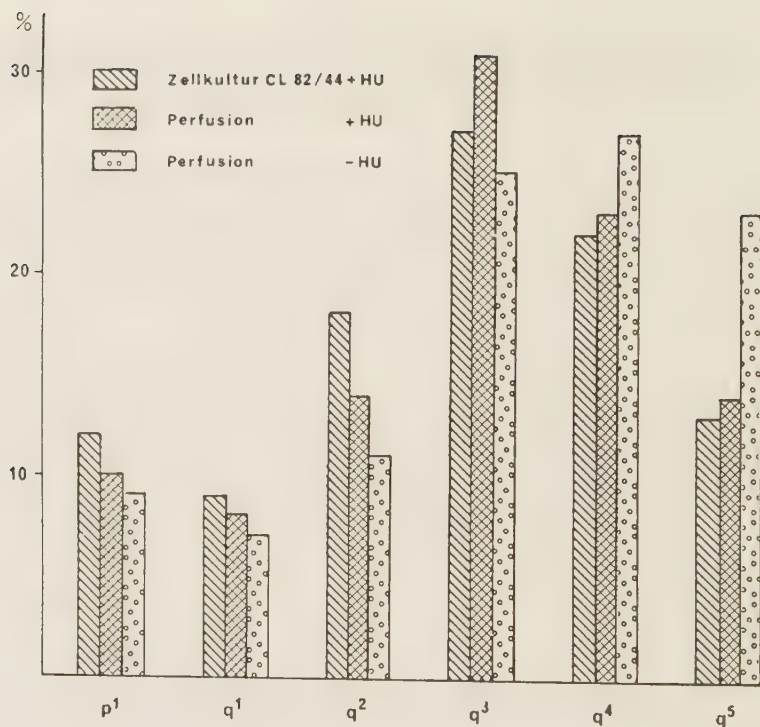


Abb.28: Vergleichendes Histogramm der prozentualen Verteilung der Silbergranula pro Chromosomenabschnitt des Chromosoms # 1:

- in vitro: In praeneoplastischen Zellen der Linie CL 8244 mit HU-Synchronisation (Zellkultur CL 8244 + HU)
- in vivo: In normalen Hepatozyten mit HU-Synchronisation (Perfusion + HU)
- in vivo: In normalen Hepatozyten ohne HU-Synchronisation (Perfusion - HU)

4. DISKUSSION

4.1. Probleme bei der Darstellung des Karyotyps der Ratte aus normalen, adulten Hepatozyten nach Collagenase-Perfusion der Leber.

Die Kenntnis des normalen Karyotyps von *Rattus norvegicus* ist Voraussetzung für die Feststellung chromosomaler Aberrationen in praeneoplastischen oder neoplastischen Zellen der Ratte. Bereits 1973 konnte ein internationales Komitee Einigung über den standardisierten Karyotyp von *Rattus norvegicus* erzielen (Committee for a standardized Karyotype of *Rattus norvegicus* 1973).

Im Hinblick auf den Vergleich mit Tumorzellen der Leber in verschiedenen Stadien der Cancerogenese sollte hier der Versuch unternommen werden, die Chromosomen der Ratte auch aus normalen Leberzellen zu präparieren. Im Gegensatz zu Fibroblasten, embryonalen Zellen und Lymphozyten sind normale adulte Hepatozyten *in vitro* nicht proliferationsfähig, so daß Chromosomen aus nativ präparierten Hepatozyten der regenerierenden Leber gewonnen werden mußten. Chromosomenpräparationen aus Zellen, die nicht zuvor in Kultur proliferieren, sind schwierig. Dies ergab sich auch aus Direkt-Präparationen anderer Zelltypen, wie Blasen-Carcinom (Smeets et al., 1985) und Seminomzellen (Atkin und Baker 1985). In dem vorliegenden Versuch wurde die Methode der Collagenase-Perfusion zur Gewinnung von Mitosen aus normaler Leber der Ratte ausgearbeitet.

Als optimale Methode, Chromosomen aus Leberzellen zu gewinnen, ergab sich, Lebergewebe durch PH zur Proliferation anzuregen, durch Dauerinfusion mit HU die DNS-Synthese zu synchronisieren, die Mitosen durch Colchizin-Gabe zu arretieren und Hepatozyten durch Collagenase-Perfusion der Leber zu isolieren. Diese Schritte sind einerseits erforderlich, um eine große Anzahl an Mitosen zu gewinnen, ande-

rerseits werden Leberzellen jedoch bei diesem Vorgehen erheblich alteriert.

Der Proliferationsstimulus durch PH führt zu einer Hypertrophie der Leberzellen (Schmidkonz, 1979). Das durchschnittliche Volumen von Hepatozyten nicht hepatektomierter Tiere von $6365 \mu\text{m}^3$ steigt nach der PH auf $8029 \mu\text{m}^3$ an. Elektronenoptisch zeigt sich eine Zunahme der Volumendichte der Lysosomen und Mikrobodies, eine Oberflächenzunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums und eine Schwellung der Mitochondrien als Zeichen der Zellschädigung (Schmidkonz et al., 1977). Biochemisch erfolgt innerhalb von zwei Stunden ein völliger Glycogenabbau (Bade, 1964). Unter der Gabe von HU wird trotz fast vollständiger Hemmung der DNS-Synthese die RNS- und Protein-Synthese fortgesetzt. Eine solche Dissoziation der makromolekularen Synthese wurde als "unbalanced growth" (Cohen, 1954) bezeichnet. Es erfolgt dabei eine weitere Hypertrophie der Leberparenchymzellen mit einer Zellvolumen-Zunahme um etwa 30 %. Sie wird begleitet von einer Größenzunahme der Zellkerne. Ab der 6. Stunde nach PH tritt zunächst eine feintropfige, später grobtropfige Verfettung der Hepatozyten ein, die sich nach HU-Infusion noch verstärkt. Die Verfettung breitet sich von periportal nach perivenös aus (Jordan, 1964). Sie entspricht damit dem toxischen Verfettungs-Typ.

Bei der Anwendung von Colchizin müssen neben der beabsichtigten Zerstörung der Kernteilungsspindel auch toxische Nebenwirkungen in Kauf genommen werden. Bei Mäusen wurden nach chronischer Intoxikation (12 - 15 ng Colchizin für 20-30 Tage) Kernatypien in Leberzellen beobachtet. Eine einmalige Injektion der LD 50 führte bei Mäusen innerhalb einer Stunde zur fettigen Leberzell-Degeneration. Weibliche Tiere scheinen dafür weniger empfindlich zu sein, was auf endokrine Faktoren zurückgeführt wird (Eigsti und Dustin, 1954).

Trotz dieser möglichen Schädigung kann zur Gewinnung einer ausreichenden Zahl von Mitosen aus Hepatozyten auf die PH und die Colchizin-Applikation nicht verzichtet werden. Eine HU-Dauerexposition ist dagegen nur dann erforderlich, wenn, wie bei der Darstellung des Replikationsmusters in der frühen S-Phase, eine Zellsynchronisation vorausgesetzt werden muß. Denn durch diesen Kunstgriff läßt sich eine exakte Markierung frühreplizierender Chromosomenabschnitte erreichen. Ein weiterer Vorteil der HU-Infusion besteht darin, daß infolge der Zellsynchronisation durch HU mehr Zellen in die DNS-Synthese und anschließend in die Mitose-Phase einlaufen, so daß eine höhere Ausbeute an Mitosen zu erwarten wäre. Dieser erwünschte Effekt wird jedoch durch die Toxizität des HU eingeschränkt, so daß die Ausbeute an Mitosen durch eine HU-Synchronisation letztlich nicht erhöht werden kann. Aber auch ohne HU-Infusion konnte auf Grund der beschriebenen Vorschädigung der Leberzellen infolge PH und Colchizin-Exposition nur ein Vitalitätsindex von 50 % erzielt werden. Zellen im Mitosestadium zeigen wegen ihres im Vergleich zu nicht-mitotischen Zellen relativ größeren Volumens eine erhöhte Vulnerabilität.

Gelingt es trotz dieser Schwierigkeiten, Mitosen in ausreichender Zahl zu gewinnen, so bleibt dennoch die einwandfreie Bandenfärbung dieser in vivo präparierten Chromosomen problematisch. Die Methode der Trypsin-Giemsa-Färbung von Chromosomen aus kultivierten Zellen läßt sich nicht ohne Modifikation auf Chromosomen aus nativen Leberzellen anwenden. Die Chromosomen aus Zellen der perfundierten Leber reagieren sehr viel empfindlicher auf die enzymatische Behandlung mit Trypsin als Chromosomen kultivierter Zellen. Die Trypsinkonzentration muß daher erniedrigt und die Einwirkungszeit verkürzt werden (2.1.7.). Dennoch kann nicht die gleiche Qualität der Bandenfärbung wie bei Chromosomen aus kultivierten Zellen erzielt wer-

den. Es wird vermutet, daß Chromosomen bereits durch die Collagenasebehandlung geschädigt werden (Smeets, 1985).

Die Collagenase-Perfusion ermöglicht andererseits die Gewinnung einer Einzelzellsuspension von Leberzellen. Das ist Voraussetzung für eine gute Spreitung der Mitosen. Bei der Chromosomen-Analyse von Lymphozyten ist eine Einzelzellsuspension bereits vorgegeben. Aus diesem Grunde wurden vermutlich bisher weit mehr cytogenetische Untersuchungen von Leukämien und verwandten myelo- bzw. lymphoproliferativen Erkrankungen vorgenommen, als von Tumorgeewebe mit festem Zellverband (Gropp, 1982).

Für eine Direktpräparation von Chromosomen aus normalem oder neoplastischem Gewebe müßte dieses mechanisch mit Schere, Skalpell oder Tissue chopper zerkleinert werden. Dabei würde DNA aus den Kernen frei, die zur Verklebung der Zellen führt. Die Collagenase-Perfusion der Leber bietet die Möglichkeit, den festen Zellverband auf schonende Weise in eine Einzelzellsuspension zu überführen. Dies erklärt den hohen Anteil vitaler Leberzellen nach Collagenase-Perfusion, wobei ohne vorangegangene PH, HU-Infusion und Colchizin-Applikation ein Trypanblauindex von nahezu 100 % erreicht werden kann (Seglen, 1972). Durch die so erzielte Einzellsuspension wird eine gute Spreitung der Mitosen möglich.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden mit Hilfe der Perfusions-Technik nur Chromosomen aus normalen Rattenleberzellen präpariert. Da die in vitro-Propagierung praeneo- bzw. neoplastischer Leberzellen das Risiko einer sekundären Chromosomen-Aberration in sich birgt, wäre es wünschenswert, die Chromosomen dieser Zellen ebenfalls direkt aus perfundierter Leber zu gewinnen. Dazu müßte die Technik der Perfusion mit besonderen Selektionsverfahren oder mit einer spezifischen Markierung der Zielzellen kombiniert werden. Es wurden daher Methoden der selek-

tiven Isolierung versucht, die auf der fehlenden Eisen-Akkumulierung praeneoplastischer Zellen, im Gegensatz zu normalen Leberparenchymzellen, basieren (Williams, 1976). Nach Induktion praeneoplastischer Herde, Dauerexposition von Eisendextran und anschließender Collagenase-Perfusion wurde versucht, die eisenfreie Population mittels Elutriationszentrifugation abzutrennen. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung praeneoplastischer Zellen wäre eine spezifische Antikörper-Markierung in Verbindung mit Cell-sorting. Als Marker wäre ein Antikörper geeignet, der gegen die für praeneoplastische Zellen charakteristische Gamma-Glutamyltransferase gerichtet ist (Vanderlaan et al., 1979) oder ein Antikörper gegen Oberflächen-Antigene, für die praeneoplastische Zellen defizient sind, wie z.B. Asialglycoproteine (Evarts et al., 1984). Vorerst mußte hier jedoch für die cytogenetische Untersuchung (prae-)neoplastischer Leberzellen der Weg über die Kultur in Kauf genommen werden, wobei der Wachstumsvorteil (prae-)neoplastischer Zellen gegenüber normalen Parenchymzellen (Rabes et al., 1982) für die selektive Propagierung genutzt wurde.

4.2. Cytogenetischer Vergleich durch Diethylnitrosamin induzierter praeneo- und neoplastischer Leberzellen und mögliche Beziehungen chromosomaler Aberrationen zu Genalteration.

Daß eine positive Korrelation zwischen chromosomalen Aberrationen und maligner Transformation vorliegt, ist in zahlreichen Untersuchungen belegt worden. In mehr als 95 % aller bisher untersuchten Neoplasien wurden strukturelle oder numerische Aberrationen von Chromosomen vorgefunden (Chorazy, 1985).

Fehlen des Nachweises chromosomaler Aberrationen bei Tumoren kann nicht als Beweis gegen die Hypothese angeführt werden, daß Krebs mit Veränderungen an den Chromosomen assoziiert sein kann, da ein Rearrangement mindestens 10^6 Basenpaare betreffen muß, um es lichtmikroskopisch erfassen zu können (Radman et al., 1982).

Ungeklärt ist bisher die Frage, ob chromosomale Aberrationen als Ursache oder nur als Symptom maligner Transformation zu werten sind. Es gibt einige Argumente, die dafür sprechen, daß es sich bei chromosomalen Aberrationen in Tumorzellen nicht nur um sekundäre Schäden handelt, die während der Tumorprogression auftreten, sondern daß chromosomale Veränderungen auch ursächlich bei der Tumorentstehung beteiligt sind:

1. Chromosomale Aberrationen wurden bereits in sehr frühen Tumorstadien gefunden.
2. Es wurden bestimmte Gene definiert, die bei chromosomalen Aberrationen miteinbezogen sind.
3. Bei einigen Tumoren liegen ganz charakteristische Veränderungen vor (Tab. 6).

Tab. 6: Charakteristische Aberrationen verschiedener menschlicher Tumoren, modifiziert und ergänzt von weiteren Autoren (s.u.), nach J.J. Yunis 1983.
(del = Deletion, t = Translokation, dupl = Duplikation, recip = reciproke Translokation, iso = Isochromosom, inv = Inversion, p = kurzer Arm, q = langer Arm).

Tumor	Chromosomale Aberration	Autor
Kleinz. Bronchial-Ca	del 3p	Falor et al. 1985
Colon-Ca	del 12q	Hossfeld 1985
hereditäres Nieren-Ca	t (3; 11)	Yunis 1983
Ovarial-Ca.	t (6; 14)	Yunis 1983
Seminom	dupl 1q, del 1p, iso 12p	Atkin u. Baker 1985
Melanom	del 6q	Hossfeld 1985
Meningeom	- 22	Zankel u. Zang 1980
Neuroblastom	del 1p	Yunis 1983
Wilms-Tumor	del 11p	Francke et al. 1979
Retinoblastom	del 13q	Yunis 1983
Burkitt-Lymphom	t (8; 14) od. t (2; 8) od. t (8; 22)	Klein 1983
akute lymphat. Leuk.	t (9; 22) od. t (8; 14)	Yunis 1983
akute myeloblast. Leuk.	t (8; 21)	Yunis 1983
akute promyelozyt. Leuk.	t (15; 17)	Yunis 1983
chron. lymphat. Leuk.	t (11; 14)	Yunis 1983
chron. myeloische Leuk.	t (9; 22)	Nowell und Hungerford, 1960

Da in verschiedenen Tumoren typische chromosomale Veränderungen auftreten, stellt sich die Frage, ob dies auch für Zell-Linien von Lebertumoren zutrifft. Bei den untersuchten Linien CL 8238-42 und CL 8244 wiesen vorwiegend die Chromosomen # 1, 2, 3, 7, 11, 12, 13, 14 Aberrationen auf.

1967 wurde die Morris-Hepatom-Zell-Linie erstmals von Nowell cytogenetisch untersucht. Zu dieser Zeit war die Trypsin-Giemsa-Technik noch nicht etabliert. Kovi und Morris haben 1982 sieben Morris-Hepatom-Zell-Linien nach Bandenfärbung erneut analysiert. Sie stellten fest, daß die Chromosomen # 2, 6, 10 überzufällig häufig an chromosomalen Aberrationen beteiligt waren. Für eine Zell-Linie des Novikoff-Hepatoms wurden von Unakul und Hsu (1972) besonders Veränderungen an den Chromosomen # 1, 2, 6 beschrieben.

Bei den hier untersuchten CL-Linien wurden wie bei den Morris- und Novikoff-Hepatomen übereinstimmend akrozentrische Chromosomen von Aberrationen betroffen. Die akrozentrischen Chromosomen der Ratte sind länger als die meisten metazentrischen Chromosomen, und es ist anzunehmen, daß ihre Bruchstabilität daher geringer ist. Andererseits sind Veränderungen an den kleineren metazentrischen Chromosomen nur bei guter Auflösung erkennbar.

Typische Aberrationen bei den CL-Zell-Linien sind neben fehlenden oder zusätzlichen Chromosomen Translokationen, Deletionen und zentrische Fusionen. Bei der Morris-Hepatom-Zell-Linie treten die gleichen Veränderungen und zusätzlich Inversionen auf.

Numerisch entsprechen die CL-Zell-Linien durchschnittlich dem normalen Karyotyp der Ratte (CL 8244) oder sind hyperdiploid (CL 8238-42). Unter der Zell-Linie des Morris-Hepatoms gibt es sowohl hypo-, als auch hyperdiploide Linien, eine Zell-Linie erreicht sogar eine durchschnittliche

Zahl von 114 Chromosomen. Die Chromosomenzahl von Tumorzellen kann somit erniedrigt oder erhöht sein.

Bei der Zell-Linie CL 8244, die in der 5., 18. und 39. Passage untersucht wurde, blieb die durchschnittliche Chromosomenzahl annähernd konstant. In den drei Stadien waren die gleichen Aberrationen nachweisbar. Von den sieben Morris-Hepatom-Zell-Linien hatte sich die Chromosomenzahl seit der Erstuntersuchung durch Nowell et al. (1967) bei sechs Linien um 2-9 Chromosomen verringert, bei einer Linie um das 3-fache erhöht. In zwei Linien waren die Aberrationen relativ konstant geblieben, bei den anderen Linien waren erhebliche chromosomale Veränderungen hinzugetreten. Diese Befunde machen deutlich, daß auch in vitro chromosomale Aberrationen auftreten und daß sich bei längerer Passagezeit der Karyotyp von Tumorzellen verändern kann.

Trotz einiger Gemeinsamkeiten der CL-, Morris- und Novikoff-Hepatom-Zell-Linie besteht nur eine teilweise Übereinstimmung bezüglich der veränderten Chromosomen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß unterschiedliche Carcinogene spezifische chromosomale Aberrationen bewirken. Die Novikoff- und Morris-Hepatom-Zell-Linie waren nicht wie die CL-Linie durch Diethylnitrosamin (DENA) initiiert worden.

Gegen die Annahme einer carcinogen-spezifischen Veränderung spricht jedoch, daß die beiden DENA-induzierten CL-Linien keine identischen Aberrationen zeigen und, daß andererseits fünf der Morris-Hepatom-Zell-Linien das gleiche Marker-Chromosom, eine perizentrische Inversion des Chromosoms # 2, aufwiesen, obgleich diese durch unterschiedliche Carcinogene induziert worden waren. Dies spricht für die Hypothese, daß bestimmte Chromosomen unabhängig von dem auslösenden Agens für Aberrationen prädisponiert sind. Die Untersuchung weiterer Hepatomzell-Linien wird erforderlich sein, um dies zu klären.

Als Erklärungsmöglichkeit für die Bedeutung chromosomaler Aberrationen sollen einige Vorstellungen zur chemischen Cancerogenese und der Rolle von Onkogenen in diesem Prozeß diskutiert werden. Die Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 wurden durch das chemische Carcinogen DENA induziert. Der Mechanismus, nach dem DENA zur Induktion von Tumoren führt, ist zunächst noch hypothetisch. DENA gehört in die Gruppe der alkylierenden Mutagene. Bevor es mit der DNS der Zelle interagiert, erfolgt die Metabolisierung in die aktive Form des ultimalen Carcinogens. Nur in bestimmten Organen, wie u.a. in der Leber, ist dies möglich (Bentley und Oesch, 1982). Elektrophile Ethyl-Gruppen binden kovalent an nukleophile Positionen von DNS-Basen. Für die mutagene Wirkung von DENA scheint u. a. die Bildung des O⁶-Ethyl-Guanins von Bedeutung zu sein, das als promutagene Läsion gedeutet wird (Loveless, 1969). Es kann zu Basenfehlpaarungen bei der DNS-Replikation führen (Abbott und Saffhill, 1979). Durch die Basenfehlpaarung kann eine Punktmutation entstehen. Infolge der veränderten Basensequenz könnten aberrante Peptide codiert werden. Mutationen in kritischen Genen könnten Bedeutung für die maligne Initiation haben.

In Methylnitrosoharnstoff-induzierten Mamma-Tumor-Zellen wurde auf dem 12. Codon des H-ras-1- Onkogens eine Transitionsmutation GC - AT festgestellt. Anstelle von Glycin wird in diesem Fall Glutamin in das Genprodukt eingebaut (Sukumar et al., 1983, Zarbl et al. 1985). Eine ähnliche Mutation wurde im Codon 12 des H-ras-Onkogens bei einer menschlichen Blasen-Ca-Zell- Linie T24/EJ beobachtet (Tabin et al. 1982). Es wurde überlegt, ob dem veränderten Genprodukt eine Bedeutung bei der malignen Transformation zukomme (Hunter und Sefton, 1980).

Bekanntlich handelt es sich bei Onkogenen, wie dem genannten Onkogen ras, um DNA-Sequenzen, die im normalen Genom von Säugerzellen vorliegen und Sequenzhomologien mit vira-

ler RNS aufweisen können. Über zwanzig solcher Onkogene wurden bereits gefunden. Es wurde angenommen, daß sie durch bestimmte Einflüsse, wie u.a. chemische Carcinogene, aktiviert werden können.

Außer den qualitativen Veränderungen von Onkogenen könnten quantitative Alterationen der Onkogen-Expression eine Rolle bei der malignen Transformation spielen. Bei derartigen quantitativen Prozessen dürften chromosomale Rearrangements oder Aberrationen eine Bedeutung haben. Bei der Zell-Linie CL 8244 liegt eine Translokation der Chromosomen # 3 und # 14, bei der Zell-Linie CL 8238-42 eine Translokation des Chromosoms # 11 vor. Durch Translokation können Onkogene in unterschiedlicher Weise aktiviert werden. Das zelluläre Onkogen kann in einen Bereich erhöhter Transkriptionsaktivität verlagert werden.

Das bekannteste Beispiel dafür bietet die 8,14-Translokation des Burkitt-Lymphoms. Hierbei ist das c-myc-Onkogen des Chromosoms # 8 in die Nähe des Genlocus für die konstanten Regionen schwerer Immunglobulinketten verlagert worden. Enhancer-Elemente, welche normalerweise die Produktion von Antikörpern in normalen B-Zellen steigern, aktivieren nun das c-myc-Onkogen (Klein, 1983).

Umgekehrt kann ein Onkogen infolge einer Translokation einer Kontroll-Region entzogen werden. Dies wird bei Transfektions-Versuchen deutlich, bei denen fragmentierte DNS nicht maligner Zellen in der Lage ist, normale Zellen zu transformieren, weil durch die Fragmentierung bestimmte DNS-Abschnitte von ihrer Kontroll-Region separiert werden (Hashem und Kalifa, 1975). Der Einfluß von Enhancer-Elementen oder der Entzug von Kontroll-Regionen kann demnach zu der erhöhten Transkription eines zellulären Gens führen.

Der erhöhten Transkription kann auch eine Amplifikation, d.h. eine vermehrte Expression des betreffenden Gens zugrunde liegen (Schimke, 1984). Morphologisches Äquivalent

amplifizierter DNS-Abschnitte sind sog. "homogeneously staining regions" (HSR's) der Chromosomen, die sich nach Bandenfärbung als homogen angefärbte Bereiche darstellen. Offenbar müssen Amplifikationen aber nicht notwendigerweise in diesen HSR's auftreten. Denn bei der Zell-Linie COLO 205 eines Colon-Carcinoms wurde eine 10-fache Amplifikation des Onkogens c-myc auf zwei Marker-Chromosomen gefunden, die keine HSR's aufwiesen (Winqvist et al. 1985). Auch bei den Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 konnten bisher keine HSR's nachgewiesen werden. Zu vermuten wäre eine solche Region allenfalls bei der Zell-Linie CL 8238-42 auf dem langen Arm des Marker-Chromosoms.

Es liegt aber eine Ploidie-Zunahme der Chromosomen # 2 (CL 8244), # 3, # 7 und # 12 (CL 8232-42) vor. Identisches Genmaterial ist bei diesen Zell-Linien in mehrfacher Kopie im Genom vorhanden. Dies könnte ähnliche Konsequenzen wie eine Gen-Amplifikation haben. Besondere Bedeutung könnte hierbei die Quatrosomie des Chromosoms # 7 der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42 gewinnen, da auf dem Chromosom Nr. 7 der Ratte das Oncogen myc lokalisiert wurde (Sümegi et al., 1983).

In vergleichbarer Weise ist bei der Zell-Linie PLC/PRF/5 eines hepatozellulären Carcinoms des Menschen gerade das Chromosom # 15 4-fach vorhanden, auf dem ein integration site des Hepatitis B-Virus nachgewiesen wurde (Bowcock et al., 1985).

Neben einer Vervielfachung von Chromosomen treten bei den untersuchten Zell-Linien auch Chromosomen-Verluste auf. Bei der Zell-Linie CL 8244 fehlen überzufällig häufig die Chromosomen # 7, 9, 10, bei der Zell-Linie CL 8238-42 die Chromosomen # 5, 13, 14. Manchmal fehlt auch nur ein Teil eines Chromosoms, wie bei der Deletion des Chromosoms # 1 der Zell-Linie CL 8244. Der Verlust eines Chromosoms oder eines Chromosomenstücks mit einem dominanten Gen könnte die Expression des rezessiven Gens auf dem homologen Chromosom zur Folge haben.

Beim Wilms-Tumor führt die Deletion des kurzen Arms des Chromosoms # 11 im Bereich der Bande 13 (del 11p13) zur Expression rezessiver mutierter Gene des homologen Chromosoms. Häufig ist hier die Deletion von einer Reduplikation gefolgt. Das ursprüngliche heterozygote Allel liegt dann homozygot vor (Koufos et al., 1984).

Chromosomale Rearrangements, wie Translokationen, Deletionen und Polysomie könnten somit die erhöhte Transkriptionsaktivität transformierender Gene auslösen. Ob die in den praeneo- und neoplastischen Leberzell-Linien beobachteten chromosomalen Aberrationen mit ähnlichen Wirkungen einhergehen, muß weiteren molekulargenetischen Untersuchungen überlassen bleiben.

Der cytogenetische Vergleich der beiden Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 verdeutlicht, daß es sich bei der Cancerogenese um einen mehrstufigen Prozess handeln muß. Obgleich beide Zell-Linien immortalisiert sind und chromosomale Aberrationen zeigen, war bisher nur die Zell-Linie CL 8238-42 in der Lage, nach i.p.-Injektion auf die Nacktmaus, Tumorstadium zu induzieren.

Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien beider Zell-Linien finden ihre Entsprechung in dem unterschiedlichen Maß ihrer Abweichung vom normalen Karyotyp. Die praeneoplastische Zell-Linie CL 8244 weist nur drei typische Aberrationen auf und hat durchschnittlich eine normale Chromosomenzahl von 42. Bei der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42 liegen mindestens fünf typische Aberrationen vor. Mit ihrer durchschnittlichen Chromosomenzahl von 52 ist sie deutlich hyperdiploid.

Diesen morphologisch faßbaren Merkmalen von Zellen in verschiedenen Stadien der Cancerogenese könnten, wie bereits beschrieben, molekulargenetische Ereignisse, wie die Aktivierung von zellulären Onkogenen zugrundeliegen. Es ist beschrieben worden, daß für die maligne Transformation

einer Zelle offenbar die Aktivierung von mindestens zwei Onkogenen erforderlich ist. Dies zeigten Transfektions-Versuche an embryonalen Ratten-Fibroblasten (REF) (Land et al. 1983). Durch die Transfektion des Onkogens ras konnten die Zellen nur unter bestimmten Bedingungen morphologisch verändert werden. Die transfizierten Zellen induzierten keinen Tumor auf dem Versuchstier. Auch die Applikation des Onkogens myc konnte den Phänotyp der REF's nicht wesentlich verändern. Bei der Co-Transfektion beider Onkogene entstanden jedoch dichte Foci morphologisch transformierter Zellen, die in der Nacktmaus schnell wachsende Tumoren erzeugten.

Das Gen-Produkt des ras-Gens steht in Beziehung zur Membranoberfläche, das Gen-Produkt des myc-Gens zum Kern. Möglicherweise müssen beide Angriffspunkte in der Zelle durch Onkogen-Produkte beeinflusst werden, um eine Transformation der Zelle zu bewirken.

Beide Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 wurden durch DENA induziert. Nur die Zell-Linie CL 8238-42 führte zur Tumorbildung in der Nacktmaus. Bei dieser Zell-Linie ist das Chromosom # 7, auf dem das Onkogen c-myc bei der Ratte lokalisiert wurde, drei- bis vierfach vorhanden.

Man könnte hier spekulieren, daß bei der Zell-Linie CL 8238-42 zu einer DENA-induzierten Aktivierung eines Onkogens, etwa durch Punktmutation im c-ras-Gen, eine Amplifikation des c-myc-Gens hinzugekommen sein könnte, die diese Zell-Linie zur Expression des malignen Phänotyps befähigt (Tabin et al., 1982; Reddy et al., 1982).

In-situ-Hybridisierungen mit entsprechenden Onkogen-Proben könnten Hinweise dafür bringen, ob diese Spekulationen richtig sind.

4.3. Modell zur Darstellung des Replikationsmusters in der frühen S-Phase.

Die Transformationssensitivität von Leberzellen durch DENA ist während der späten G₁ und frühen S-Phase erhöht (Rabes et al., 1979, 1986). Interessant ist daher die Untersuchung, ob sich bestimmte molekulare Ereignisse, wie die Aktivierung von Onkogenen, frühreplizierenden Abschnitten der Chromosomen zuordnen lassen.

Es sind bereits einige Beispiele frühreplizierender Gene bekannt, die für die Cancerogenese von Bedeutung sind. Bei einer Neuroblastom-Zell-Linie wird das Onkogen N-myc in der frühen S-Phase repliziert (Kohlet al., 1984), ebenso wie das Gen für die Dihydrofolat-Reduktase nach Methotrexat-Behandlung (Biedler und Spengler, 1976). Onkogene in SEWA-Maus-Sarkom-Zellen werden von der frühen bis in die mittlere S-Phase repliziert. Andererseits wird DNA in HSR's der Ratten-Hepatom-Zell-Linie HL-II-E-L erst in der mittleren bis späten S-Phase verdoppelt (Miller et al., 1979).

Bei dem vorgestellten Versuchsmodell wurde nach dem Proliferationsreiz einer PH mit und ohne HU-Synchronisation der DNS-Synthese, eine gezielte ³H-TdR-Markierung in der frühen S-Phase vorgenommen. In Kombination mit einer in-situ-Hybridisierung, mit der Onkogene auf bestimmten Chromosomenabschnitten lokalisierbar sind (Harper und Saunders, 1981), bietet die beschriebene Versuchsanordnung die Möglichkeit, Gene früh- oder spätreplizierenden Chromosomenabschnitten zuzuordnen. Die Methode wurde am Beispiel des Chromosoms # 1 demonstriert. Die Untersuchungen können damit nur modellhaft die Frage nach frühreplizierenden Genen, wie dem proliferationskorrelierten Onkogen myc beantworten.

Die präzise Erfassung der frühen S-Phase ist für die Un-

tersuchung von großer Wichtigkeit. Der Zeitpunkt kann entweder bei Kenntnis des Zell-Zyklus-Transits errechnet oder durch HU-Synchronisation der Zellen festgelegt werden. Beide Möglichkeiten wurden erprobt und miteinander verglichen. Nur auf der Bande q5 des Chromosoms # 1 unterschieden sich die Markierungsindizes HU-synchronisierter und nicht synchronisierter Zellen deutlich. Obgleich bei HU-Synchronisation ca. 5 % der Zellen den Block durchbrechen, liegt durch Kumulation der restlichen Zellen am G₁S-Übergang ein prozentual höherer Anteil in der S-Phase synchronisierter Zellen vor. Der verstärkte Markierungsindex auf der Bande q5 des Chromosoms # 1 nicht mit HU-behandelter Zellen kann daher auf eine mangelhafte Synchronisation zurückgeführt werden. Aber auch HU selbst könnte eine Verschiebung des Replikationsmusters bewirken.

An normalen Lymphozyten-Kulturen wurden unter dem Einfluß von HU Chromosomenbrüche beobachtet (Oppenheim und Fishbein, 1965). In Maus-Lymphomzellen wurde unter HU-Behandlung die Dihydrofolatreduktase-Gen-Amplifikation verstärkt (Hill und Schimke, 1985). In den untersuchten Leberzellen der Ratte traten dagegen keine Chromosomenbrüche auf. Auch im Karyotyp der mit HU behandelten praeneoplastischen Zell-Linie CL 8244 waren im Vergleich zum Karyotyp nicht HU-behandelter Zellen derselben Linie keine typischen Aberrationen nachweisbar. Die hier verwendeten HU-Konzentrationen (1,25mM/kgKG/h über 10 h bzw. 1 µMol/ml Medium) lag jedoch um mehr als das 50- fache unter der in Lymphozyten und Maus-Lymphomzell-Kultur angewandten Konzentration. HU in diesen niedrigen Konzentrationen konnte in den hier beschriebenen cytogenetischen Untersuchungen aus normalen Hepatozyten in vivo, sowie an bereits transformierten Leberzellen in vitro keine morphologisch faßbaren Aberrationen bewirken. Ob HU in diesen geringen Konzentrationen zu einer Verschiebung des Replikationsmusters auf der Bande q5 des Chromosoms # 1 führen kann, muß jedoch offen bleiben.

Nach Aufhebung des HU-Blocks können die Zellen den Proliferationszyklus fortsetzen. Es liegt offensichtlich ein Zusammenhang zwischen Zellproliferation und maligner Transformation vor. Beim Menschen ist die Inzidenz hepatozellulärer Carcinome in Lebergewebe mit einem erhöhten turnover, wie bei Lebercirrhose, deutlich erhöht. Eine Punktmutation kann nur fixiert werden, wenn ein Proliferationszyklus erfolgt. In diesem Zusammenhang gewinnt die Vermutung an Bedeutung, daß gerade dem bei der Zell-Linie CL 8238-42 möglicherweise vermehrt exprimierten Onkogen c-myc eine Triggerfunktion für den Eintritt der Zellen in die S-Phase zugeschrieben werden kann (Goyette et al., 1984). Die Annahme einer proliferationsinduzierenden Wirkung des Onkogens myc wurde durch die Beobachtung bestätigt, daß die Expression dieses Onkogens in unreifen hämatopoetischen HL-60 Zellen reduziert wurde, sobald die Zellen induziert wurden, in den differenzierten, nicht proliferativen Zell-Typ überzugehen (Kelly, 1983).

Es ist bereits bekannt, daß replizierende DNS eine erhöhte Mutationsfrequenz zeigt. Es ist daher naheliegend, daß bei einer gesteigerten DNS-Synthese einerseits die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von promutagenen Läsionen und konsekutiven Basenfehlpaarungen erhöht ist, andererseits die entsprechenden Reparatur-Enzyme mit der Elimination von Addukten nicht mehr Schritt halten können. Dies muß besonders für die O^6 -Methyltransferase zutreffen, die sich bei der Reparatur des O^6 -Methylguanins durch irreversible Bindung der Methylgruppe verbraucht und deren Kapazität daher erschöpfbar ist. Es wird dabei verständlich, daß die Transformationssensitivität in der frühen S-Phase, trotz gleichzeitig ablaufender Reparaturmechanismen erhöht ist. Die Bedeutung der frühen S-Phase der Leberzellen bei der chemischen Cancerogenese durch DENA liegt somit in der Bildung von Addukten zu diesem Zeitpunkt des Zellzyklus und in der Erschöpfbarkeit der gleichzeitig einsetzenden Reparatur-Enzyme begründet.

Es gibt Hinweise, daß bestimmte Onkogene ebenfalls während der frühen S-Phase repliziert und dabei in gesteigertem Maße für genetische Alterationen vulnerabel sind. Es wäre daher von Interesse, durch Kombination des Nachweises frühreplizierender Gene mit einer in-situ-Hybridisierung, weitere Einblicke in die Ursachen und Zusammenhänge der besonders hohen Transformationssensibilität in der frühen S-Phase zu gewinnen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Karyotyp aus normalen Hepatozyten von *Rattus norvegicus* (Wistar A/F-Han) wurde nach Direktpräparation dargestellt. Die Mitosen wurden nach Proliferationsreiz durch partielle Hepatektomie, Colchizin-Injektion (8,5 µg/kg 24 und 26 h nach PH) und Collagenase-Perfusion der Leber gewonnen und Trypsin-Giemsa gefärbt. Obgleich die Qualität der G-Banden nicht der von Chromosomen kultivierter Zellen entsprach, konnte mit dieser Technik ein weitaus besseres Ergebnis erzielt werden, als mit einer Direktpräparation aus Leberzellen ohne eine vorangegangene Zellseparation mittels Collagenase-Perfusion.

Außerdem wurden die Karyogramme zweier Leberzell-Linien, CL 8244 und CL 8238-42 untersucht. Diese Zell-Linien waren aus Diethylnitrosamin-vorbehandelter Leber (5 mg/kg/die im Trinkwasser) mittels Collagenase-Perfusion isoliert worden. Beide Zell-Linien waren in vitro proliferationsfähig, jedoch nur die Zell-Linie CL 8238-42 erwies sich als tumorigen auf der Nacktmaus. Die Zell-Linie CL 8244 wurde daher als praeneoplastisch, die Zell-Linie CL 8238-42 als neoplastisch definiert. Beide Linien zeigten unterschiedliche, für die jeweilige Zell-Linie konstante, chromosomale Aberrationen. Die numerischen und strukturellen Chromosomen-Aberrationen der neoplastischen Zell-Linie CL 8238-42 waren ausgeprägter als die der praeneoplastischen Linie CL 8244. Die durchschnittliche Chromosomenzahl der Zell-Linie CL 8244 entsprach dem normalen Karyotyp der Ratte. In 100 % der untersuchten Karyogramme fanden sich eine Deletion des Chromosoms # 1, eine Trisomie des Chromosoms # 2 und eine Translokation der Chromosomen # 3 und # 14. Die Zell-Linie CL 8238-42 war deutlich hyperdiploid. Besonders fielen eine Trisomie oder Quatrosomie der Chromosomen # 3 # 7 und # 11 auf.

Dabei war besonders die mehrfache Präsenz des Chromosoms

7 interessant, da bekanntlich auf diesem Chromosom bei der Ratte das Onkogen c-myc lokalisiert wurde.

Weitere Zusammenhänge dieser Aberrationen mit Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene wurden diskutiert.

Bei der chemischen Cancerogenese scheint dem Replikationszeitpunkt mutationssensitiver Gene eine besondere Bedeutung zuzukommen, wobei die frühe DNS-Synthesephase maximale Transformationssensitivität aufweist. Es wurde daher ein Modell zur Darstellung des Replikationsmusters normaler Hepatozyten und praeneoplastischer Zellen in der frühen DNS-Synthese-Phase entworfen. (Methyl-³H)-Thymidin wurde in vivo (0,8 µCi (29,6 kBq)/g KG) und in vitro (1 µCi (37 kBq)/ml) mit und ohne vorangegangene Hydroxyharnstoff-Synchronisation appliziert. Nach Chromosomen-Präparation und Autoradiographie zeigte sich auf dem Chromosom # 1 bei Hepatozyten in vivo und bei praeneoplastischen Zellen in vitro ein nahezu identisches Replikationsmuster. Hydroxyharnstoff schien bei Hepatozyten in vivo eine geringfügige Verschiebung in den distalen q-Bereich zu bewirken, die möglicherweise auf eine verstärkte Synchronisation der Zellen zurückzuführen ist.

Ob die genannten chromosomalen Aberrationen der Zell-Linien CL 8244 und CL 8238-42 zu einer Aktivierung von Onkogenen in Beziehung stehen und ob diese Onkogene mit der hier beschriebenen Methode auf frühreplizierenden Abschnitten der Chromosomen lokalisiert werden können, muß weiteren Untersuchungen, unter Einschluß von in-situ-Hybridisierungen mit markierten Onkogenen vorbehalten bleiben.

6. ANHANG

Anhang 1: Ca^{++} -freie Hanks-Lösung: pH 7,3

- NaCl	8,00 g
- KCl	0,40 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
- KH_2PO_4	0,06 g
- Glucose	1,00 g
- NaHCO_3	0,35 g
- Hepes	2,48 g
- Aqua dest.	ad 1000 ml

Ca^{++} -haltige Hanks-Lösung

- zusätzl. CaCl_2	0,28 g
----------------------------	--------

Anhang 2: Entwickler-Lösung

- Na_2SO_3
(Merck Art. 6657) 18,0 g
- Hydroxy-1,3-phenylendiamin-
hydrochlorid (Merck Art. 3019) 4,5 g
- KBr 10 %ig
(Merck Art. 4905) 8,0 ml
- Aqua dest. ad 1000 ml

Anhang 3: Fixier-Lösung

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
(Merck Art. 6513) 300,0 g
- $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$
(Merck Art. 5054) 30,0 g
- Aqua dest. ad 1000 ml

Anhang 4: Leber-Medium: pH 7,3

- NCTC 135*	4,85 g
- TCM 199**	5,5 g
- Glucose	4,0 g
- Lactalbuminhydrolysat	4,0 g
- L-Methionin	0,02 g
- Cystein	0,10 g
- Cholinchlorid	0,20 g
- Glutaminsäure	0,05 g
- NaHCO ₃	0,55 g
- Hepes	3,07 g
- Streptomycin	50-100 IE/ml
- Penicillin	100 IE/ml
- Aqua dest.	ad 1000 ml
- zusätzlich: fötales Kälber-Serum	10 %
Insulin	10 mU/ml

* Gibco Europe Paisley, Scotland No. 075-1100

** Difco Laboratories Detroit, Michigan USA

No. 5701-23

Anhang 5: PBS-Puffer pH 7,2

- Natriumchlorid (Merck Art. 6404) 8,0 g
- Dinatriumhydrogenphosphat
· 2 H₂O (Merck Art. 6580) 1,44 g
- Kaliumchlorid (Merck Art. 4936) 0,2 g
- Kaliumhydrogenphosphat
(Merck Art. 4873) 0,2 g
- Aqua dest. ad 1000 ml

Anhang 6: Phosphat-Puffer pH 6,8

- Kaliumdihydrogenphosphat
(Merck Art. 4873) 4,54 g
- Dinatriumhydrogenphosphat
· 2 H₂O 2H₂O (Merck Art. 6580) 5,94 g
- Aqua dest. ad 1000 ml

7. LITERATURVERZEICHNIS

ABBOTT P.J., SAFFHILL R.: DNA synthesis with methylated poly (dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine.

Biochim. Biophys. Acta 562: 51-61, 1979

AMES B.N., LEE F.D., DURSTON W.E.: An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.

Proc. Natl. Acad. Sci. 70: 782-786, 1973

ATKIN N.B., BAKER M.C.: Chromosome analysis of three seminomas.

Cancer Genet. Cytogenet. 17: 315-323, 1985

BADE E.G.: Beitrag über die Frühstadien der Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie und die Ursache des kompensatorischen Wachstums.

Virch. Arch. path. Anat. 337: 503-514, 1964

BANNASCH P.: Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules.

Cancer Res. 36: 2555-2562, 1976

BENTLEY P., OESCH F.: Foreign compound metabolism in the liver.

Progr. Liver Dis Vol. 7: 157-178, 1982

BIEDLER J.L., SPENGLER B.A.: Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products.

Science 191: 185-187, 1976

BOWCOCK A.M., PINTO M.R., BEY E., KUYL J.M., DUSHEIKO G.M.
BERNSTEIN R.: The PLC/PRF/5 human hepatoma cell line. II.
Chromosomal assignment of hepatitis B virus integration
sites.

Cancer Genet. Cytogenet. 18: 19-26, 1985

BOWMAN W.C., RAND M.J.: Arrest of metaphase.
In: Textbook of Pharmacology 3.21, 1968

CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C.: Differential binding
of alkylating fluorochromes in human chromosomes.

Exp. Cell Res. 60: 315-319, 1970

CHORAZY M.: Sequence rearrangements and genome instabili-
ty. A possible step in carcinogenesis.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 109: 159-172, 1985

COHEN S.S., BARNER H.D.: Studies on unbalanced growth in
Escherichia Coli.

Proc. Natl. Acad. Sci. 40: 885-593, 1954

COMMITTEE for a standardized karyotype of Rattus norvegi-
cus: Standard karyotype of the Norway rat, Rattus norvegi-
cus.

Cytogenet. Cell Genet. 12: 199-205, 1973

DUTRILLAUX B., COUTURIER J. (Übers.: Murken J.): Praktikum
der Chromosomenanalyse.

Ence-Verl. Stuttgart, p. 5, 1983

EIGSTI O.J., DUSTIN P.J.: Colchicine in agriculture, me-
dicine, biology and chemistry.

The Iowa State College Press, Ames, Iowa, U.S.A. p.
191-193, 1954

EVARTS R.P., MARSDEN E., HANNA P., WIRTH P.J., THORGEIRSON S.S.: Isolation of preneoplastic rat liver cells by centrifugal elutriation and binding to asialofetuin..
Cancer Res. 44: 5718-5724, 1984

FARBER E.: The sequential analysis of liver cancer induction.
Biochim Biophys Acta 605: 149-166, 1980

FALOR W.H., WARD-SKINNER R., WEGRYN S.: A 3p deletion in small cell lung carcinoma.
Cancer Genet. Cytogenet. 16: 175-177, 1985

FOULDS L.: The natural history of cancer.
J. Chron. Dis. 8: 2-37, 1958

FRANCKE U., HOLMES L.B., ATKINS L., RICCARDI V.M.: Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13.
Cytogenet. Cell Genet. 24: 185-192, 1979

GOYETTE M., PETROPOULOS C.J., SHANK P.R., FAUSTO N.: Regulated transcription of c-Ki-ras and c-myc during compensatory growth of rat liver.
Mol. Cell. Biol. 4: 1493-1498, 1984

GRANBERG-ÖHMAN I., TRIBUKAIT B., WIJKSTROM H., ALIM A., BERLIN T.: Chromosome and DNA cytometric study of papillary carcinoma of the bladder with a high stemline and numerous double minutes.
Cancer Genet. Cytogenet. 5: 227-235, 1982

GROPP A.: Chromosomengenetik und Krebs.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 66: 82-97, 1982

HARPER M.E., SAUNDERS G.F.: Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization.

Chromosoma, 83: 431-439, 1981

HASHEM N., KHALIFA S.: Retinoblastoma: A model of hereditary fragile chromosomal regions.

Hum. Hered. 25: 35-49, 1975

HIGGINS G.M., ANDERSON R.M.: Experimental pathology of the liver; restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.

Arch. Pathol. 12: 186-202, 1931

HILL A.B., SCHIMKE R.T.: Increased gene amplification in L 5178Y mouse lymphoma cells with hydroxyurea-induced chromosomal aberrations.

Cancer Res. Vol. 45: 5050-5057, 1985

HOSSFELD D.K.: Zytogenetik maligner Erkrankungen In: Gross R., Schmidt C.G. (Hrsg.) Klinische Onkologie, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 8.21, 1985

HUNTER T., SEFTON B.M.: Transforming gene product of Rous sarkoma virus phosphorylates tyrosine.

Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 1311-1315, 1980

ISELER G.: Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung.

Inaugural-Dissertation, München 1977

JORDAN S.W.: Electron microscopy of hepatic regeneration.

Exp. Molec. Pathol. 3: 183-200, 1964

KELLY K., COCHRAN B.H., STILES C.D., LEDER P.: Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth-factor.

Cell 35: 603-610, 1983

KERLER R., RABES H.M.: In vitro propagation of preneoplastic hepatocytes initiated in vivo by Diethylnitrosamine.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 111 (Suppl.) S46, 1986

KLEIN G.: The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis.

Nature 294: 313-318, 1981

KLEIN G.: Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and men.

Cell 32:311-315, 1983

KOHL N.E., GEE C.E., ALT F.W.: Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors.

Science 226, 1335-1337, 1984

KOUFOS A., HANSEN M.F., LAMPKIN B.C., WORKMAN M.L., COPELAND N.G., JENKINS N.A., CAVENEE W.K.: Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumor.

Nature 309: 170-172, 1984

KOVI E., MORRIS H.P.: Chromosome banding studies of several transplantable hepatomaas.

Adv. Enzyme Regul. 139-162, 1976

LAND H., PARADA L.F., WEINBERG R.A.: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis.

Science 222: 171-178, 1983

LAND H., PARADA L.F., WEINBERG R.A.: Tumorigenic conversion of primary embryofibroblasts requires at least two cooperating oncogenes.

Nature Vol. 304: 596-602, 1983

LAISHES B.A., ROBERTS B.A., FARBER E.: In vitro measurement of carcinogen-resistant liver cells during hepatocarcinogenesis.

Int. J. Cancer 21: 186-193, 1978

LEVAN G.: Nomenclature for G-bands in rat chromosomes.

Hereditas 77: 37-52, 1974

LOVELESS A.: Possible relevance of the O^6 -alkylations of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides.

Nature 233: 206-207, 1969

MEER B., HAMEISTER H., CERRILLO M.: Early and later replication patterns of increased resolution in human lymphocyte chromosomes.

Chromosoma 82: 315-319, 1981

MILLER O.J., TANTRAVAHU R., MILLER D.A., YU L.C., SZABO P., PRENSKY W.: Marked increase in ribosomal RNA gene multiplicity in a rat hepatoma cell line.

Chromosoma 71: 183-195, 1979

MODJANOVA E.A., MALENKOV A.G.: Alterations of properties of cell contacts during progression of hepatomas.

Exp. Cell Res. 76: 305-314, 1973

MOORHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMAN W.J., BATTIPS D.M., HUNGERFORD D.A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.

Exp. Cell. Res. 20: 613-616, 1960

NOWELL P.C., HUNGERFORD D.A.: Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes.

J. Nat. Cancer Inst., 25: 85-109, 1960

NOWELL P.C., MORRIS H.P., POTTER V.R.: Chromosomes of "minimal deviation" hepatomas and some other transplantable rat tumors.

Cancer Res. 27: 1565-1579, 1967

OPPENHEIM J.J., FISHBEIN W.N.: Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxyurea and related compounds.

Cancer Res. 25: 980-985, 1965

ÖZKINAY C., MITELMAN F.: A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes.

Hereditas 90: 1-4, 1979

PAUL J.: Vitalfärbungen In: Zell- und Gewebekulturen, Walter de Gruyter. Berlin, New York, p. 351, 1980

PERRY P., WOLFF S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids.

Nature 251, 156-158, 1974

RABES H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver.

Prog. Liver Dis. 5: 83-99, 1976

RABES H.M., BÜCHER T., HARTMANN A., LINKE I., DÜNNWALD M.: Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient pre-neoplastic cell populations in mouse liver.

Cancer Res. 42: 3220-3227, 1982

RABES H.M., ISELER G., CZICHOS S., TUCZEK H.V.: Synchronization of hepatocellular DNA-synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea.

Cancer Res. 37: 1105-1111, 1977

RABES H.M., KERLER R., WILHELM R., RODE G., RIESS H.: Alkylation of DNA and RNA by ^{14}C -dimethylnitrosamine in hydroxyurea-synchronized regenerating rat liver.

Cancer Res. 39: 4228-4236, 1979

RABES H.M., MÜLLER L., HARTMANN A., KERLER R., SCHUSTER C.: Cell cycle-dependent initiation of adenosine triphosphatase-deficient populations in adult rat liver by a single dose of N-methyl-N-nitrosourea. Cancer Res. 46: 645-650, 1986

RABES H.M., SCHOLZE P., JANTSCH B.: Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient preneoplastic liver cell populations in vivo and in vitro.

Cancer Res. 32: 2577-2586, 1972

RABES H.M., TUCZEK H.V.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie.

Virch. Arch. (Zellpathol.) 6: 302-312, 1970

RABES H.M., WIRSCHING R., TUCZEK H.V., ISELER G.: Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy.

Cell Tissue Kinet. 9: 517-532, 1976

RADMAN M., JEGGO P., WAGNER R.: Chromosomal rearrangement and carcinogenesis.

Mutat. Res. 98: 249-264, 1982

REDDY, E.P., REYNOLDS R.K., SANTOS E., BARBACID M.: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 bladder carcinoma oncogene. Nature 300, 149-152, 1982

SCHIMKE R.T.: Gene amplification, drug resistance and cancer. Cancer Res. 44: 1735-1742, 1984

SCHMIDKONZ P.: Serologische-morphometrische Untersuchungen an der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung. Inaugural-Dissertation, München 1979

SCHMIDKONZ P., HÜBNER G., RABES H.M.: Morphometrische Untersuchungen zur hepatozellulären "Hypertrophie" bei Hydroxyharnstoff-induziertem "unbalanced growth". Verh. Dtsch. Ges. Path. 61: 473, 1977

SCHNEDL W., SCHNEDL M.: Banding patterns in rat chromosomes (*Rattus norvegicus*). Cytogenetics 11: 188-196, 1972

SEABRIGHT M.: A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2: 971-972, 1971

SEGLEN P.O.: Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca^{++} on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. Exp. Cell.Res. 74: 450-454, 1972

SMEETS W., PAUWELS R., GERAEDTS J.: Chromosomal analysis of bladder cancer: technical aspects. Cancer Genet. Cytogenet. 16: 259-268, 1985

SPECTOR S.W.: Handbook of Toxicology Vol I, p. 74-75.
W. B. Saunders Company Philadelphia and London, 1956

SPOONER M.E., COOPER E.H.: Chromosome constitution of
transitional cell carcinoma of the urinary bladder.
Cancer 29: 1401-1412, 1972

STANDING COMMITTEE on human genetic nomenclature: An Inter-
national system for human cytogenetic Nomenclature (ISCN).
Cytogenet. Cell Genet. 21: 318, 1978

SUKUMAR S., NOTARIO V., MARTIN-ZANCA D., BARBACID B.: In-
duction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methyl-
urea involves malignant activation of H-ras-1 locus by
single point mutations.
Nature 306: 658-661, 1983

SÜMEGI J., SPIRA J., BAZIN H., SZPIRER J., LEVAN G., KLEIN
G. : Rat c-myc oncogene is located on chromosome 7 and
rearranges in immunocytomas with t (6; 7) chromosomal
translocation.
Nature 306: 497-498, 1983

SUMNER A.T., EVANS H.J., BUCKLAND R.A.: New technique for
distinguishing between human chromosomes.
Nature 232: 31-32, 1971

TABIN C.J., BRADLEY S.M., BARGMANN C.I., WEINBERG R.A.,
PAPAGEORGE A.G., SCOLNICK E.M., DHAR R., LOWY D.R., CHANG
E.H.: Mechanism of activation of a human oncogene.
Nature 300: 143-149, 1982

TJIO J.H., LEVAN A.: The chromosome number of man.
Am. J. Obstet. Gynecol. 130: 723-724

UNAKUL W., HSU T.C.: The C- and G-banding patterns of *Rattus norvegicus* chromosomes.

J. Natl. Cancer Inst. 49: 1425-1431, 1972

VANDERLAAN M., CUTTLER C., DOLBEARE F.: Flow microfluorometric identification of liver cells with elevated -glutamyltranspeptidase activity after carcinogen exposure.

J. Histochem. Cytochem. 27: 114-119, 1979

VERNOLE P., NERI G., SERRA A.: A new banding technique of rat (*Rattus norvegicus*) chromosomes.

Hereditas 101: 199-204, 1984

WAGNER G.: Epidemiologie des Krebses. In: Gross R., Schmidt C.G. (Hrsg.), Klinische Onkologie, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2.1, 1985

WILLIAMS G.M.: Functional markers and growth behavior of preneoplastic hepatocytes.

Cancer Res. 36: 2540-2543, 1976

WILLIAMS G.M.: The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens.

Biochim. Biophys. Acta 605: 167-189, 1980

WILLIAMS G.M., KLAIBER M., FARBER E.: Differences in growth of transplants of liver, liver hyperplastic nodules, and hepatocellular carcinomas in the mammary fat pad.

Am. J. Pathol. 89, 379-388, 1977

WINQVIST R., KNUUTILA S., LEPRINCE D., STEHELIN D., ALITALO K.: Mapping of amplified c-myc oncogene, sister chromatid exchanges, and karyotypic analysis of the COLO 205 colon carcinoma cell line.

Cancer Genet. Cytogenet. 18: 251-264, 1985

YUNIS J.J.: High resolution of human chromosomes.
Science 191: 1268-1267, 1976

YUNIS J.J.: The chromosomal basis of human neoplasia.
Science 221: 227-236, 1983

ZANKL H., ZANG K.D.: Correlations between clinical and cytogenetical data in 180 human meningeomas.
Cancer Genet. Cytogenet. 1: 351-356, 1980

ZARBL H., SUKUMAR S., ARTHUR A. V., MARTIN-ZANCA D., BARBACID M.: Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats.
Nature 315: 382-385, 1985

LEBENS LAUF

- 14.4.1955 in Mannheim geboren, als Tochter
des Textilkaufmanns Dr. phil.
Hans Holecek und seiner Ehefrau
Ursula, geb. Gulde
- 1962-1966 Grundschule in Mannheim
- 1966-1974 Liselotte-Gymnasium in Mannheim,
Abschluß: Abitur
- 1975-1977 MTA-Schule am Städtischen Klinikum
in Mannheim,
Abschluß: Staatsexamen
- Juli 77 - Jan. 78 MTA am Pathologischen Institut der
Fakultät für Klinische Medizin
Mannheim der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. U.Bleyl)
- 1978-1983 Studium der Human-Medizin an den
Universitäten Kiel, Ulm, Wien
- Juli/Aug. 81 Famulatur an der Universität von
Alberta, Edmonton (Kanada)
Fachgebiet: Tumorummunologie
- 1983-1984 Praktisches Jahr an der FU Berlin
Wahlfach: Dermatologie
- 29.04.1984 Approbation
- 1984-1986 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
in der Experimentellen Abteilung
des Pathologischen Instituts
der Universität München
(Leiter: Prof. Dr. H.M.Rabes)
- seit 1.5.1986 Assistentin am Pathologischen In-
stitut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. M.Eder)

